

LÍVIA ESTEVES MARÇAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**ESTUDO DO SISTEMA NADPH OXIDASE E
ATIVIDADE GLUTATIONA PEROXIDASE CELULAR EM
GRANULÓCITOS E CÉLULAS MONONUCLEARES DE
CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ASMA SEGUNDO A
GRAVIDADE DA DOENÇA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Este exemplar corresponde a versão final do exemplar da Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Pediatria.

Campinas, 17 de Janeiro de 2001.



Prof. Dr. Antonio Condino
Orientador

LÍVIA ESTEVES MARÇAL

**ESTUDO DO SISTEMA NADPH OXIDASE E ATIVIDADE
GLUTATIONA PEROXIDASE CELULAR EM
GRANULÓCITOS E CÉLULAS MONONUCLEARES DE
CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ASMA SEGUNDO A
GRAVIDADE DA DOENÇA**

ORIENTADOR PROF. DR. ANTONIO CONDINO NETO

Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção
do Título de Mestre em Pediatria.

**CAMPINAS
2001**



648507002

UNIDADE	80
L. CHAMADA:	UNICAMP
	M33e
V.	Ex.
TOMBO BC	44086
PROC.	10-092101
C	☐ D ☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	25/04/01
N.º CPD	

CM-00154688-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

~~M331e~~

M33L

Marçal, Livia Esteves

Estudo do sistema NADPH oxidase e atividade glutationala peroxidase celular em granulócitos e células mononucleares de crianças e adolescentes com asma segundo a gravidade da doença / Livia Esteves Marçal. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Antonio Condino Neto

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Asma em crianças. 2. Radicais livres (Química). I. Antonio Condino Neto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

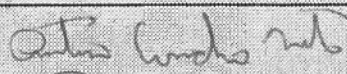
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

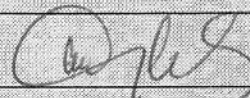
Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Membros:

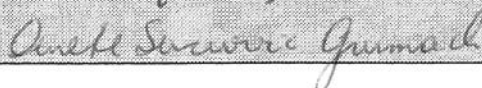
1. Prof. Dr. Antonio Condino Neto



2. Prof^a. Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela



3. Prof^a. Dr^a. Anete Sevciovic Grumach



Curso de Pós-Graduação em Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/01/01

Dedico este trabalho

A meus pais e irmão, pelo incentivo e exemplo de grandes pessoas e profissionais que são.

Ao meu esposo, pelo amor, compreensão e intensa colaboração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto, meu orientador, pelo apoio e dedicação em todas as etapas deste trabalho. Toda minha gratidão e admiração.

À Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela e ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro, do Setor de Imunologia-Alergia e Pneumologia Pediátrica da FCM-UNICAMP, pelas críticas e sugestões.

À Dra. Adyleia Aparecida Toro, do Setor de Imunologia-Alergia e Pneumologia Pediátrica da FCM-UNICAMP, pelo auxílio no atendimento aos pacientes do ambulatório.

À bióloga e amiga Jussara Rehder pela sua competência, dedicação e disposição em ajudar, sempre.

À colega e amiga Cristina Frias Sartorelli, pela sua participação e ajuda em todas as fases do trabalho.

Aos colegas Dr. Péricles Dias-da-Mota, Dra. Mônica Freitas Leitão, Dra. Ana Lúcia Amoras, Dra. Anna Lúcia de Campos Mello e Dra. Elianete B. Silva pelo incentivo e auxílio a este trabalho.

A Elisabeth Cristina Cambiucci, Maria Helena C. Mazzola e Maria do Rosário C. Boer, pelo apoio.

A Josefina Eliane Ribeiro, pelo auxílio nas provas de função pulmonar.

Aos amigos Fernanda Cristina Pereira Negrão, Silvana Dalge Severino, Kelen Nardi, Gabriela Terracini, Ana Paula Buchar Nappi, Ana Lúcia D'Agostino e Luiz Paulo Beltrame pelo apoio e amizade.

A Helymar da Costa Machado e Cleyde Moreira Silva, responsáveis pela análise estatística dos dados.

A Simone Cristina Ferreira, secretária da Subcomissão de Pós-Graduação em Pediatria do CIPED, pela sua colaboração neste trabalho.

Aos voluntários, pacientes e seus familiares pela inestimável colaboração.

Aos funcionários do CIPOI e CIPED, pelo apoio.

À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Considerações Iniciais	2
1.2. Reativos Intermediários do Oxigênio	3
1.3. O Sistema NADPH Oxidase	7
1.4. Glutathione Peroxidase Celular	10
1.5. Reativos Intermediários do Oxigênio e Asma	12
1.6. Mecanismos Antioxidantes e Asma	19
1.7. Justificativa do Trabalho	22
2. Objetivo	23
3. Metodologia	25
3.1. Casuística e Protocolo Clínico	26
3.2. Critérios de Exclusão	28
3.3. Adultos Sadios	28
3.4. Protocolo Laboratorial	29
3.4.1. Atividade do Sistema NADPH oxidase	29
3.4.2. Conteúdo do citocromo b_{558}	30
3.4.3. Atividade da Glutathione Peroxidase Celular	31
3.5. Análise Estatística	31
3.6. Aspectos Éticos	33
4. Resultados	34
4.1. Atividade do Sistema NADPH Oxidase	35
4.2. Citocromo b_{558}	47
4.3. Atividade Glutathione Peroxidase Celular	49
5. Discussão	53
5.1. Atividade do Sistema NADPH Oxidase	55
5.2. Conteúdo de Citocromo b_{558}	59
5.3. Atividade Glutathione Peroxidase Celular	60
6. Conclusões	63
7. Summary	66
8. Referências Bibliográficas	68
9. Bibliografia de Normatizações	86
10. Anexos	88

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Asma Intermitente Leve	AIL
Asma Persistente Leve	APL
Asma Persistente Moderada	APM
Asma Persistente Grave	APG
Forbol miristato acetato	PMA
“Global Initiative for Asthma”	GINA
Glutathiona peroxidase	GSH-Px
Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenase	NADPH
Superóxido	O ₂ ⁻
Superóxido dismutase	SOD
Volume expiratório forçado no primeiro segundo	VEF ₁

RESUMO

RESUMO

A asma, como outras doenças alérgicas, caracteriza-se por distúrbios do sistema imunológico e alterações funcionais de várias linhagens de células inflamatórias, dentre as quais os fagócitos. Estes contêm uma NADPH oxidase associada à membrana, que produz superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio, responsáveis por atividades microbicida, tumoricida e inflamatória, mas que constituem, também, fator de risco para injúria oxidativa dos tecidos, durante os processos inflamatórios. Os reativos intermediários do oxigênio têm vários efeitos já documentados na patogênese da asma. O objetivo deste trabalho foi investigar aspectos bioquímicos do sistema NADPH oxidase e glutathione peroxidase celular dos granulócitos e células mononucleares de crianças e adolescentes asmáticos, segundo a gravidade da doença. O estudo incluiu 66 crianças e adolescentes de 6 a 16 anos e 40 indivíduos saudáveis. Os pacientes foram submetidos a investigação laboratorial de rotina, testes alérgicos e prova de função pulmonar e classificados de acordo com os critérios do GINA-NIH, 1997. Amostras de sangue periférico foram colhidas dos pacientes e indivíduos saudáveis para realização dos ensaios sobre atividade NADPH oxidase (44 pacientes e 28 saudáveis), conteúdo do citocromo b_{558} (30 pacientes e 8 saudáveis) e GSH-Px celular (22 pacientes e 10 saudáveis). Os resultados foram agrupados em textos e gráficos para análise estatística. Foram utilizados Análise de Variância (ANOVA) para comparar a liberação de superóxido entre os grupos, teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar o conteúdo de citocromo b_{558} e a GSH-Px celular entre grupos. Observamos maior liberação de superóxido por granulócitos dos pacientes asmáticos com sintomatologia persistente e com maior comprometimento da função pulmonar quando comparada à de indivíduos saudáveis ou portadores de asma intermitente ($p < 0,05$). Células mononucleares estimuladas com PMA de pacientes com asma e $VEF_1 < 60\%$ também liberaram mais superóxido do que células mononucleares de indivíduos saudáveis e asmáticos com obstrução leve ($VEF_1 > 80\%$) ou moderada (VEF_1 entre 60 e 80%) ($p < 0,05$). Não encontramos diferença significativa nas dosagens de citocromo b_{558} nem na atividade GSH-Px celular em granulócitos e células mononucleares, entre os diversos grupos de pacientes asmáticos e os indivíduos saudáveis. Estes resultados demonstram que a liberação de superóxido por leucócitos do sangue periférico é um parâmetro que correlaciona o processo inflamatório na asma com a gravidade da doença, já que em pacientes mais graves esta foi maior do que naqueles com quadro clínico mais leve e nos indivíduos saudáveis. Estes achados sugerem uma possível utilização deste método pouco invasivo como monitorização da inflamação e injúria pulmonar.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Iniciais

Radicais livres são definidos como quaisquer átomos ou moléculas com um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa que podem existir independentemente por um período de tempo (HALLIWELL, 1991; HALLIWELL, 1984). Exemplos de radicais livres são: ânion superóxido (O_2^-), tiol ($RS\cdot$), triclorometil (CCl_3) e óxido nítrico ($NO\cdot$). Os radicais O_2^- e $NO\cdot$ são produzidos continuamente *in vivo*, com implicações fisiológicas e patológicas.

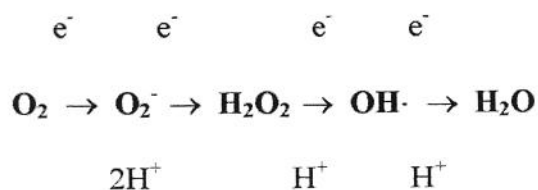
Radicais livres sempre reagem com outras moléculas, buscando configuração eletrônica pareada e, portanto, quimicamente estável. Eles podem doar elétrons (atividade redutora) ou captar elétrons (atividade oxidante), ou simplesmente reagir com outros radicais (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1994; HALLIWELL, 1995; WISEMAN & HALLIWELL, 1996). É esta afinidade dos radicais livres em doar ou captar elétrons de outras moléculas ou combinar-se com outras moléculas que os faz tão instáveis (KERR, BENDER, MONTI, 1996).

Os radicais livres são subprodutos de muitas reações normais do organismo que incluem a geração de energia, catabolismo de lípidos e proteínas, e liberação de catecolaminas (IKEDA & LONG, 1990) estando implicados também num grande número de patologias decorrentes de fenômenos inflamatórios, isquêmicos, radioativos e de envelhecimento (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1994; HALLIWELL, 1995; WISEMAN & HALLIWELL, 1996).

Como consequência, ao longo de sua evolução, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidantes ou sistemas reparadores, que previnem o acúmulo de moléculas oxidadas ou reduzidas. Os radicais são neutralizados por enzimas ou antioxidantes naturais que bloqueiam sua formação inicial, limitam a formação de radicais livres durante reações em cadeia e reparam os danos causados pelos mesmos (DIPLOCK, 1994). Um exemplo é a enzima superóxido dismutase (SOD), que converte O_2^- , seu substrato específico, em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Sua descoberta por McCORD & FRIDOVICH (1969), levou ao raciocínio de que O_2^- é formado *in vivo* e SOD existe para removê-lo.

1.2. Reativos Intermediários do Oxigênio

O oxigênio molecular é usado primariamente na produção de energia celular por meio da síntese de adenosina trifosfato (ATP) pela fosforilação oxidativa, com transferência de elétrons de uma molécula para outra (KERR et al., 1996). No seu estado basal, o oxigênio molecular é um birradical, possuindo dois elétrons não pareados em orbitais paralelos (TAUBE, 1965; OGRYZLO, 1978). A redução completa do O_2 pela via univalente resulta na formação de água e O_2^- , peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$) como reativos intermediários (HALLIWELL, 1994):



O termo reativos intermediários do oxigênio engloba os radicais livres centrados no oxigênio, como o O_2^- e radical hidroxila ($OH\cdot$), além de outras espécies reativas que não são radicais livres, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio “singlet” ($^1\Delta_g$) e ácido hipocloroso ($HOCl$) (HALLIWELL, 1994).

O aumento abrupto no consumo de oxigênio durante a fagocitose foi descrito inicialmente por BALDRIDGE & GERARD (1933). Este evento metabólico é conhecido como “explosão respiratória” (“respiratory burst” em língua inglesa) e tem o O_2^- como produto inicial da redução de um elétron do O_2 (BABIOR, KIPNES, CURNUTTE, 1973; CHANOCK et al., 1994), sendo a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenase (NADPH) a doadora específica de elétrons (ROSSI & ZATTI, 1964), de acordo com a reação:



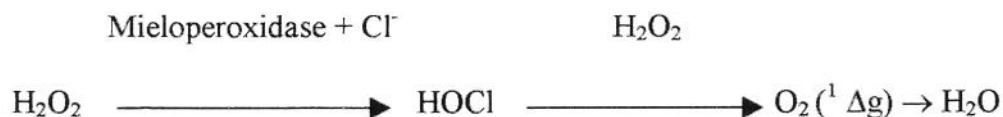
O complexo enzimático que catalisa a redução do O_2 para O_2^- é denominado sistema NADPH oxidase. A fonte contínua de NADPH para os fagócitos é a via das hexoses monofosfato (ROSSI & ZATTI, 1964).

O O_2^- é reduzido para H_2O_2 . Este fenômeno tem sua velocidade aumentada por um fator 10^9 quando catalisado pela SOD (McCORD & FRIDOVICH, 1969), constituindo o principal mecanismo fisiológico de remoção do O_2^- :

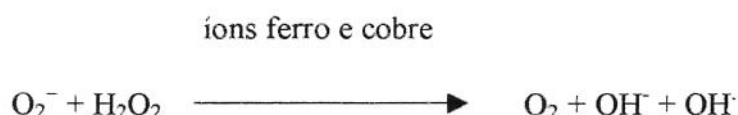
SOD



O H_2O_2 é substrato para a mieloperoxidase gerar produtos oxidativos como o ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio “singlet” ($^1\Delta\text{g}$) (KLEBANOFF, 1970):



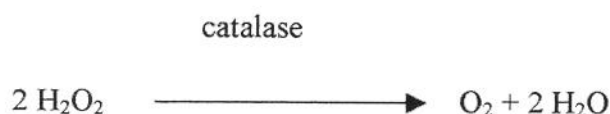
A redução de três elétrons do O_2 resulta em $\text{OH}^\cdot$. Este pode ser gerado a partir do O_2^- e H_2O_2 na presença de íons ferro e cobre por meio de uma reação Fenton conforme proposto por HABER & WEISS (1934):



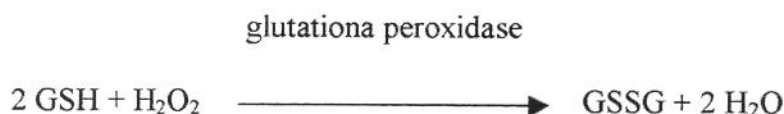
A demonstração *in vitro* de que os reativos intermediários do oxigênio são gerados no interior dos fagossomas dos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos (BABIOR, 1978), com propriedades bactericidas (BABIOR, CURNUTTE, KIPNES, 1975), sugere que os mesmos possam ser liberados para o meio extracelular nos tecidos inflamados. O $\text{OH}^\cdot$ é o oxidante mais instável que se conhece. Sendo tão reativo, provoca reação em cadeia, atacando e danificando quase todas as moléculas das células vivas em microsegundos (DORFMAN & ADAMS, 1975). O H_2O_2 em altas concentrações danifica o DNA, rompe membranas e libera cálcio, ativando as enzimas proteolíticas intracelulares cálcio dependentes, o que é lesivo para as células (PRYOR, 1978), além de servir de substrato para a mieloperoxidase gerar HOCl (KLEBANOFF, 1970), um potente oxidante

com efeito microbicida. O HOCl por sua vez, ao reagir com compostos nitrogenados, gera cloraminas, também com reconhecida ação microbicida (KLEBANOFF, 1970).

O H_2O_2 pode ser removido de duas maneiras. Numa delas é reduzido pela catalase (DE DUVE, 1978):



Na outra, o H_2O_2 é utilizado pela glutathiona peroxidase para oxidar a glutathiona reduzida (DE DUVE, 1978). A glutathiona peroxidase (GSH-Px) é a única enzima do organismo que requer selênio (LEVANDER et al., 1983; LEVANDER, 1984; LEVANDER & BURK, 1986):



Uma vez que O_2^- e H_2O_2 são relativamente atóxicos e que existem mecanismos para sua remoção (SOD, catalase, GSH-Px) somente a falha ou sobrecarga destes resultariam no acúmulo de $\text{OH}^\bullet$ intracelularmente. Assim, o estudo da geração de $\text{OH}^\bullet$ nos tecidos vivos torna-se fundamental para a compreensão dos mecanismos de lesão induzidos pelas espécies reativas do O_2 .

O consumo de O_2 em neutrófilos humanos aumenta de 50 a 100 vezes, em menos de cinco segundos, após estimulação específica (BABIOR, 1978). Os estímulos fisiológicos para o desencadeamento da “explosão respiratória” são microorganismos opsonizados, o fragmento C_{5a} do sistema complemento, metionilpeptídeos *N*-formilados bacterianos,

lípidos bioativos como o ácido araquidônico, fator ativador de plaquetas, leucotrieno B₄ (KOO, LEFKOWITZ, SNYDERMAN, 1982; KOO, LEFKOWITZ, SNYDERMAN, 1983; McPHAIL & SNYDERMAN, 1983; McPHAIL, CLAYTON, SNYDERMAN, 1984; McPHAIL et al., 1985) e interleucina 8 (BAGGIOLINI, WALZ, KUNKEL, 1989). Todos estes fatores contêm receptores específicos na membrana celular e além de desencadearem a “explosão respiratória”, são quimiotáticos. Outros estímulos não fisiológicos incluem fluoretos (CURNUTTE, BABIOR, KARNOVSKY, 1979), ésteres de forbol como o 4β-forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (ROBINSON et al., 1985), o ionóforo de cálcio A23187 (BECKER, SIGMAN, OLIVER, 1979) e partículas de zimosan opsonizado (BURNHAM et al., 1989). A “explosão respiratória” dos fagócitos é instável e de curta duração, cessando em segundos quando o agonista é removido (SKLAR, 1986).

1.3. O Sistema NADPH Oxidase

Os fagócitos, tais como macrófagos, granulócitos e eosinófilos, contêm uma NADPH oxidase associada à membrana, a qual produz O₂⁻ e outros reativos intermediários do O₂, responsáveis por atividades microbicida, tumoricida e inflamatória (CHANOCK et al., 1994; HENDERSON & CHAPPEL, 1996). Linfócitos B (VOLKMAN et al., 1984), fibroblastos (MEIER et al., 1991), plaquetas (SALVEMINI et al., 1989) e células endoteliais (MATSUBARA & ZIFF, 1986a; MATSUBARA & ZIFF, 1986b) também geram quantidades significativas de O₂⁻ sob condições experimentais específicas.

Este sistema é quiescente em células em repouso mas sofre ativação quando as células são expostas a estímulos apropriados (CHANOCK et al., 1994).

Defeitos na atividade oxidase ligados à doença granulomatosa crônica levam a infecções graves, potencialmente letais, que demonstram a importância primária e a relevância clínica dos reativos intermediários do O_2 como mecanismo microbicida (QUIE, 1993; CURNUTTE, ORKIN, DINAUER, 1994). Entretanto, a geração de reativos intermediários do O_2 pelos fagócitos é também motivo de dano tissular em condições diversas como infecções, injúria isquêmica, artrite, doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes (HALLIWELL, 1995; McCORD et al., 1994), e podem também contribuir para a indução de mutações e carcinogênese (WISEMAN & HALLIWELL, 1996).

O complexo enzimático responsável pela geração de O_2^- forma um pequeno sistema de transporte de elétrons transmembranoso que resulta na oxidação do NADPH na superfície citoplasmática e na geração de O_2^- na superfície externa da membrana, a qual se torna a superfície interna do fagolisossoma, durante a fagocitose (PARKOS et al., 1988; JESAITIS et al., 1990). O conhecimento dos componentes do sistema NADPH oxidase, seus genes e suas relações estruturais, tem sido alvo de vários estudos (ROYER-POKORA et al., 1986; VOLPP, NAUSEEF, CLARK, 1988; NUNOI et al., 1988; DINAUER et al., 1990; LETO et al., 1990).

O doador terminal de elétrons ao O_2 é um flavocitocromo *b* de baixo potencial (SEGAL et al., 1978; SEGAL & ABO, 1993) localizado primariamente na membrana plasmática (JESAITIS et al., 1990), sendo encontrado nos grânulos secundários e gelatinase (KJELDSEN et al., 1993) e, em menor escala, nas vesículas secretoras (CALAFAT et al., 1993). O flavocitocromo *b* fagocítico é composto por uma glicoproteína de 91 kDa, denominada gp91-*phox* (glicoproteína, 91 kDa, “**p**hagocyte **o**xidase”) e um polipeptídeo não glicosilado de 22 kDa, denominado p22-*phox* (PARKOS et al., 1987). Os genes para a

gp91-*phox* e p22-*phox* podem sofrer mutações, responsáveis respectivamente pela forma ligada ao sexo e uma das formas autossômicas recessivas da doença granulomatosa crônica (CROSS et al., 1996; ROOS et al., 1996). As subunidades do flavocitocromo *b* fagocítico, foram os primeiros componentes do sistema NADPH oxidase a ser identificados e clonados (ROYER-POKORA et al., 1996).

A ativação do sistema NADPH oxidase requer a modificação química e translocação de subunidades adicionais do citosol para o complexo oxidase na membrana celular (McPHAIL et al., 1985; BABIOR, KUPER, CURNUTTE, 1988; CURNUTTE, SCOTT, MAYO, 1989). Dois destes polipeptídeos com Mr 47 kDa e 67 kDa (p47- *phox* e p67- *phox*) foram identificados e seus genes clonados (LETO et al., 1990; LOMAX et al., 1989). Defeitos num destes dois componentes citosólicos, respondem pela maioria dos casos de doença granulomatosa crônica autossômica recessiva (VOLPP, NAUSEEF, CLARK, 1988; CROSS et al., 1996; ROOS et al., 1996). Nas etapas iniciais de ativação, a p47- *phox* sofre fosforilação em nove resíduos de serina na sequência C-terminal, em particular nos resíduos 303 e 304 (EL BENNA, FAUSTE, BARBIOR, 1994). Duas proteínas G de baixo peso molecular se integram ao sistema NADPH oxidase fagocítico: a proteína rac2 transloca-se com os componentes citosólicos; a rap 1 associa-se ao componente p22-*phox* na membrana (QUINN et al., 1989). Estas proteínas contribuem para a estabilização do complexo enzimático e regulam sua atividade biológica (GABIG et al., 1995; KNAUS et al., 1995). Um novo componente citosólico foi recentemente identificado e clonado. Trata-se da proteína p40- *phox*, a qual associa-se à p67- *phox* (WIENTJES et al., 1993; ZHAN et al., 1996). Seu papel na atividade do sistema NADPH oxidase ainda não foi totalmente esclarecido.

Os estudos sobre a especificidade tissular e expressão dos genes que codificam as duas cadeias do flavocitocromo *b* revelaram que o gene *gp91-phox* expressa-se predominantemente nos fagócitos e o gene *p22-phox* constitutivamente em várias linhagens celulares (ROYER-POKORA et al., 1986; PARKOS et al., 1988). Entretanto, os dois genes são induzidos paralelamente por várias citocinas, principalmente pelo interferon-gama (IFN- γ), nos monócitos/macrófagos e granulócitos (NEWBURGER et al., 1988; NEWBURGER, DAI, WHITNEY, 1991).

1.4. Glutathione Peroxidase Celular

A glutathione peroxidase celular (GSH-Px, EC 1.11.1.9) é uma enzima citosólica (TAPPEL, 1984) presente na maioria das células eucarióticas. Catalisa a redução dos peróxidos e hidroxiperóxidos provenientes de ácidos graxos insaturados, ácidos nucleicos e outras importantes biomoléculas (TAPPEL, 1984; FLOHE, 1985) para seus respectivos álcoois, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como doadora específica de elétrons (TAPPEL et al., 1984; MILLS, 1957). Em condições fisiológicas a GSH-Px é mais ativa do que a catalase (incapaz de reduzir peróxidos orgânicos), além de ter uma constante de Michaelis (K_m) mais alta para o peróxido de hidrogênio (COHEN, 1963). Existe uma marcada variação na atividade da GSH-Px nos diferentes tecidos, sendo que nos eritrócitos sua atividade é consideravelmente menor do que nos polimorfonucleares e macrófagos (BEASLEY, THOMPSON, PEARCE, 1991). Portanto, a GSH-Px representa um importante mecanismo de defesa celular contra a injúria oxidativa. Tal defesa é particularmente crítica para os fagócitos, os quais estão sujeitos a auto-oxidação em função

de sua “explosão respiratória (*“respiratory burst”*), fenômeno que gera grande quantidade de reativos intermediários do oxigênio (BAEHNER et al., 1977; BAKER & COHEN, 1984; BOXER, 1990).

A GSH-Px celular é a melhor caracterizada de uma grande família de enzimas de mamíferos, que inclui a forma plasmática, hidroxiperóxido lipídica, e gastrointestinal (CHAMBERS et al., 1986; MULLENBACH et al., 1987; ESWORTHY et al., 1991; TAKAHASHI, NEWBURGER, COHEN, 1986; CHU, DOROSHOW, ESWORTHY, 1993). A GSH-Px celular é uma proteína tetramérica com quatro subunidades idênticas, cada uma contendo um átomo de selênio na forma de selenocisteína no sítio ativo (DEAGEN et al., 1993). A GSH-Px plasmática também é composta por quatro subunidades contendo selênio, mas é glicosilada e compartilha somente 44% de homologia estrutural em relação à forma celular (TAKAHASHI et al., 1990). Esta família de selenoproteínas pertence ao único grupo de polipeptídeos de células procarióticas e eucarióticas que incorporam o raro aminoácido selenocisteína (BURK & HILL, 1993). A primeira clonagem bem sucedida do gene GSH-Px (GSH-Px murina), ocorreu quase ao acaso, durante o rastreamento de espécies de cDNA expressos durante a diferenciação de células murinas eritroleucêmicas (CHAMBERS et al., 1986). Vários estudos sobre o efeito do selênio na expressão dos genes GSH-Px *in vivo* e *in vitro* foram publicados (SAEDI et al., 1988; YOSHIMURA et al., 1988; REDDY et al., 1988; BAKER et al., 1993; HILL, LYONS, BURK, 1992; CHADA, WHITNEY, NEWBURGER, 1989). Durante a diferenciação das células fagocíticas HL-60 e PBL 985, os níveis da selenoenzima aumentaram paralelamente à atividade transcripcional de seu gene, bem como ao acúmulo de seu mRNA estável (SHEN et al., 1994). Portanto, a expressão do gene GSH-Px celular humano é induzida pelo

processo de diferenciação celular e regulado ao nível transcripcional. Sua tradução é regulada pelo selênio (CHADA et al., 1989).

1.5. Reativos Intermediários do Oxigênio e Asma

A asma é uma doença pulmonar caracterizada por obstrução reversível, inflamação e hiperreatividade das vias aéreas. Tais alterações manifestam-se clinicamente por tosse, sibilância e dispnéia, sintomas que aparecem associados ou isoladamente (BUSSE & REED, 1993). A asma evolui como doença crônica, comum na faixa etária pediátrica, sendo que sua prevalência pode atingir 10% ou índices mais elevados, dependendo da população estudada (BUSSE & REED, 1993). No Brasil, dados recentes revelam uma prevalência de asma de 4,7% a 20,7% na faixa etária de 6 a 7 anos e 4,8% a 21,9% na faixa de 13 a 14 anos (II CONSENSO BRASILEIRO NO MANEJO DA ASMA, 1998).

Na última década, com o desenvolvimento das técnicas de broncoscopia e imunohistoquímica, grande ênfase vem sendo dada ao processo inflamatório crônico das vias aéreas. A compreensão das complexas interações das células inflamatórias e de seus mediadores vem ganhando importância no estudo da fisiopatologia da asma e também no avanço terapêutico.

Por meio do estudo dos padrões de secreção das citocinas, as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (células indutoras/auxiliares) foram classificadas em Th1 e Th2 (BASS, MOSMANN, STROBER, 1989). Os clones Th1 e Th2 são estimulados pelo IFN-gama e IL4 e têm sua resposta inibida pela IL10. Embora algumas citocinas (IL2, IL3, IL6, IL10, TNF-alfa e GM-CSF) sejam produzidas pelos dois clones, suas propriedades funcionais são

diferentes (para revisão, CROCE et al., 1997).

As células Th1 são, em geral, definidas pela sua síntese de IL-2, interferon (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- β) e estão envolvidas na imunidade celular; enquanto as células Th2 são responsáveis pela produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 e estão envolvidas na resposta imune humoral e alergia (BORISH & ROSENWASSER, 1997).

As células Th2 estão especialmente envolvidas na patogênese da asma, devido à produção de IL5, que atua sobre os eosinófilos e IL-4, que induz a síntese de IgE (ROBINSON et al., 1992). Em estudo populacional, BURROWS et al. (1989) observaram que a prevalência de asma está primariamente relacionada ao nível de IgE sérica, enquanto a rinite alérgica associa-se com testes cutâneos de hipersensibilidade a aeroalérgenos comuns, independentemente do nível sérico de IgE.

À semelhança de outras doenças alérgicas, a asma é caracterizada por distúrbios do sistema imunológico, tais como incremento na produção de IgE (MORRISON & HIGENBOTTAN, 1989) e de vários mediadores inflamatórios (fator ativador de plaquetas, leucotrienos, histamina e citocinas) e conseqüentes alterações funcionais de várias linhagens de células inflamatórias (mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos) (DJUKANOVIC et al., 1990; KAY, 1991), como resposta adaptativa a diversos antígenos. As alterações na regulação da síntese de IgE ocorrem devido ao desbalanço funcional entre subpopulações de linfócitos T CD4, havendo hiperatividade das células Th2, quando estimuladas antigenicamente. Tal desbalanço resulta em maior produção de IL-4 pelos linfócitos T CD4 (WIERENGA et al., 1991), excessiva produção de citocinas e mediadores solúveis, os quais ativam ou “primam” outras linhagem celulares, dentre as quais os granulócitos e monócitos/macrófagos, os quais tendem a responder

exageradamente aos estímulos (KOWNASTZKI, KAPP, UHRICH, 1988; KLEBANOFF et al., 1986; NATHAN, 1989; SULLIVAN et al., 1989). Na asma, o processo inflamatório das vias aéreas correlaciona-se ao aparecimento dos sintomas (BUSSE & REED, 1993).

Algumas células, já largamente estudadas, têm definido o seu papel nas respostas imediata e tardia. É o caso dos mastócitos, que quando ativados sofrem degranulação, liberando histamina e triptase e dão início e regulam o infiltrado inflamatório após exposição ao antígeno (acumulando e ativando linfócitos T e eosinófilos) (BIERMAN et al., 1996). Os eosinófilos, uma das principais células efetoras da inflamação nas vias aéreas, são capazes de produzir metabólitos pró-inflamatórios do ácido araquidônico e ânion superóxido tóxico. Graças a estas características, a asma é conceituada como Bronquite Crônica Eosinofílica (BIERMAN et al., 1996).

No entanto, outras células, como macrófagos e neutrófilos, ainda não têm totalmente esclarecidos seus papéis no processo inflamatório. Os macrófagos funcionam como células apresentadoras de antígenos, liberam eicosanóides, fragmentos do complemento e citocinas e produzem reativos intermediários do oxigênio e enzimas proteolíticas (HORWITZ et al., 1995).

Os neutrófilos correspondem a aproximadamente metade das células brancas circulantes e são caracterizados por núcleo multilobulado e diferentes grânulos citoplasmáticos. Sua função primordial é de defesa do hospedeiro, especialmente por meio da fagocitose e destruição dos patógenos nos tecidos (MONTESEIRÍN et al., 1996).

A partir de estímulos apropriados, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células epiteliais, e possivelmente mastócitos podem liberar reativos intermediários do oxigênio por meio de vários mecanismos. Estes mecanismos incluem o metabolismo do ácido

araquidônico pelas enzimas ciclooxigenase e 5-lipooxigenase, resultando na formação de prostaglandinas e leucotrienos (ABRAHAM, 1997).

Os neutrófilos geram lesão tissular pela liberação de metabólitos tóxicos do oxigênio, componentes granulares, produtos do metabolismo do ácido araquidônico e por meio da síntese e secreção de novas proteínas (MONTESEIRÍN et al., 1996). Produzem ainda elastase - implicada juntamente com o colágeno produzido pelos miofibroblastos, na perda de elasticidade da parede brônquica e na obstrução brônquica irreversível (FUJISAWA et al., 1990).

Quando liberados em grande quantidade, os reativos intermediários do oxigênio, produtos do sistema NADPH oxidase de fagócitos profissionais ativados, constituem fator de risco para injúria tissular (HALLIWELL, 1995; WISEMAN & HALLIWELL, 1996; McCORD et al., 1994). Estão implicados no processo de envelhecimento e, também, direta ou indiretamente em mais de 50 doenças. (KERR et al., 1996) e numa grande variedade de desordens clínicas como aterosclerose, injúria de reperfusão, toxicidade pulmonar, degeneração macular, cataratogênese e câncer (KNIGHT, 1995). Participam da patogênese de patologias respiratórias como síndrome da angústia respiratória aguda (BARNES, 1990), lesão das vias respiratórias inferiores em fumantes (RICHTER et al., 1986) e doença pulmonar intersticial em crianças (CLEMENT, CHADELAT, MASHAD, 1987).

Na asma, os efeitos já documentados destes radicais livres incluem contração da musculatura lisa brônquica, aumento da permeabilidade vascular, geração de fatores quimiotáticos e peroxidação lipídica, levando à produção de mediadores secundários com efeito broncoconstritor (HANCOCK, 1997). Também já foi demonstrado que a liberação destes mediadores induz a hiperresponsividade, aumenta a secreção de muco, inibe a

atividade ciliar e lentifica o clareamento do muco (SEYBOLD et al., 1992; ABRAHAM, 1997). Adicionalmente, níveis elevados de peróxido de hidrogênio e produtos reativos do ácido tiobarbitúrico foram encontrados no expirado de pacientes asmáticos (ANTCZAK et al., 1997).

MELTZER et al. (1989) observaram que a liberação de superóxido por neutrófilos de sangue periférico, estimulados tanto por FMLP como por PMA, foi significativamente maior nos indivíduos com asma do que nos sadios. Obtiveram uma inibição dose dependente da liberação estimulada por FMLP de O_2^- , tanto nos pacientes asmáticos como nos indivíduos normais. Estudaram também a relação entre liberação de O_2^- e a hiperreatividade das vias aéreas nos indivíduos com asma e encontraram correlação inversa significativa entre PC_{20} e liberação de O_2^- pelos neutrófilos em cada paciente com asma. RENKEMA et al. (1989) encontraram correlação significativa entre o grau de hiperreatividade brônquica e liberação de O_2^- por polimorfonucleares, em fumantes e ex-fumantes, sugerindo que reativos intermediários do oxigênio modulam o grau de hiperreatividade brônquica de pacientes não alérgicos com obstrução crônica ao fluxo aéreo.

Células da linhagem mielomonocítica de pacientes atópicos hiperexpressam o receptor de baixa afinidade para IgE, CD23 (BUSSE & REED, 1993). A expressão de CD23 na superfície dos monócitos de pacientes alérgicos (asma ou rinite) correlaciona-se com o aumento da liberação de O_2^- , sugerindo que a IgE liga-se ao CD23, ativando o sistema NADPH oxidase (DEMOLY et al., 1994). O IFN- γ ativa a produção de O_2^- por monócitos do sangue periférico de pacientes asmáticos (DEMOLY et al., 1995), sugerindo que a expressão do receptor de IFN- γ possa ativar o sistema NADPH oxidase de pacientes

com asma alérgica. VACHIER et al. (1992) observaram que monócitos do sangue periférico de asmáticos liberam mais O_2^- do que os de controles sadios.

Sinais químicos gerados no tecido afetado dão início à migração do neutrófilo por meio da microcirculação. O acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas é um evento controlado. Entretanto, nos pacientes alérgicos, este acúmulo constitui importante fator de risco para dano tissular. Estudos mostram que os neutrófilos predominam no tecido afetado, nas primeiras oito horas após a exposição antigênica, sendo depois substituídos por eosinófilos (FUJISAWA et al., 1990). GÓRSKI et al. (1993) observaram maior produção de reativos intermediários do oxigênio por eosinófilos de asmáticos em relação aos de indivíduos normais. SCHAUER et al. (1991) observaram que eosinófilos de crianças asmáticas liberam mais O_2^- se comparados a neutrófilos dos mesmos pacientes ou eosinófilos e neutrófilos de controles sadios. KATO et al. (1991) demonstraram que polimorfonucleares de crianças asmáticas produzem mais O_2^- do que os de controles sadios, e que esta produção é ainda maior durante a crise aguda. TERAMOTO et al. (1996) observaram que a atividade NADPH oxidase de polimorfonucleares está aumentada em pacientes asmáticos e naqueles com doença pulmonar obstrutiva crônica. VARGAS et al. (1998) observaram maior produção de O_2^- por granulócitos de asmáticos em crise e no período intercrítico do que em granulócitos de controles sadios. Em contrapartida, atividade NADPH oxidase semelhante ou diminuída em eosinófilos de asmáticos, comparada a de indivíduos sadios, já foi descrita por outros grupos (SEDGWICK, GEIGER, BUSSE, 1990; WOSCHNAGG, RAK, VENGE, 1996).

Trabalhos mais recentes têm investigado as inter-relações do sistema NADPH oxidase de fagócitos com moléculas de adesão e fatores de transcrição. NAGATA,

SEDGWICK, BUSSE (1997) encontraram um efeito sinérgico da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e o fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) na estimulação de eosinófilos de pacientes atópicos. CHIHARA et al. (1998) demonstraram o papel do RANTES (uma quimiocina da subfamília C-C) na inflamação alérgica por meio de seu envolvimento na infiltração seletiva de eosinófilos e na ativação destas células pelo aumento de seu metabolismo oxidativo. CHEN et al. (1999) relataram a ativação inapropriada do fator de transcrição NF-Kappa B (fator ativado por vários agentes incluindo os radicais livres) como um evento associado ao processo inflamatório presente na asma e outras patologias.

Alguns autores vêm estudando o papel de drogas utilizadas no tratamento da asma na liberação de superóxido. EZEAMUZIE & AL-HAGE (1998) demonstraram que salbutamol, salmeterol, teofilina, denbufilina, cromoglicato de sódio e azelastina inibem a liberação de superóxido por eosinófilos de sangue periférico. CALHOUN et al. (1998) observaram que a liberação de superóxido por macrófagos alveolares de pacientes com asma alérgica diminui após sete dias de tratamento com zafirlukast.

1.6. Mecanismos Antioxidantes e Asma

A atividade GSH-Px e sua regulação pelo selênio foram investigadas no plasma e células do sangue periférico em asmáticos. LINN et al. (1978) não detectaram diferença significativa na atividade GSH-Px em hemácias de asmáticos após exposição ao ozônio, situação que estimula a liberação de radicais do oxigênio. WARD et al. (1984) encontraram atividade GSH-Px significativamente aumentada no sangue de crianças com asma e epilepsia controlada, mas não observaram alteração nas concentrações de selênio naqueles pacientes. FLATT et al. (1990) não observaram diferença na concentração de selênio ou atividade GSH-Px no plasma de asmáticos da Nova Zelândia, entretanto ambos os parâmetros foram mais baixos no sangue total daqueles pacientes. HASSELMARK et al. (1990) encontraram atividade GSH-Px plaquetária significativamente menor em asmáticos em relação aos controles. A média do selênio sérico nestes pacientes tendeu a ser menor do que nos controles, porém sem significância estatística. POWELL et al. (1994) observaram reduzida atividade GSH-Px eritrocitária em crianças asmáticas comparadas a controles sadios. KADRABOVA et al. (1996) encontraram concentrações diminuídas de selênio no plasma e nos eritrócitos de pacientes com asma intrínseca, assim como diminuição da atividade GSH-Px plasmática e eritrocitária destes pacientes.

A atividade GSH-Px foi estudada no plasma e células do sangue periférico de asmáticos sensíveis à aspirina. PEARSON et al. (1991) demonstraram níveis decrescentes da atividade GSH-Px plaquetária respectivamente em controles normais, alérgicos não asmáticos, asmáticos tolerantes à aspirina e asmáticos sensíveis à aspirina. PLAZA et al. (1995) não encontraram diferença na atividade GSH-Px plaquetária entre os grupos de

indivíduos saudáveis, asmáticos e asmáticos sensíveis à aspirina. KADRABOVA et al. (1996) não observaram diferença significativa na concentração plasmática de selênio entre asmáticos com e sem sensibilidade à aspirina.

Existem também estudos da atividade glutathiona peroxidase em lavado brônquico e em células epiteliais. SMITH, HOUSTON, JAMES (1993) estudaram os níveis de SOD (superóxido dismutase) e GSH nos fluidos brônquico e alveolar de asmáticos e indivíduos normais, não obtendo diferença nos níveis de SOD brônquico ou alveolar entre os dois grupos, porém encontraram 80% mais GSH no fluido brônquico dos pacientes, o que se correlaciona com a hiperreatividade. Os níveis de GSH nos asmáticos também foram maiores no fluido alveolar. Este mesmo grupo estudou as atividades de SOD, catalase (CAT) e enzimas do ciclo de redução da glutathiona em células do lavado e do epitélio brônquico de asmáticos (STONE et al., 1989), encontrando diminuição na atividade da SOD, mas não constatarem nenhuma alteração das demais enzimas. DE REAVE et al. (1997) não encontraram diferença significativa entre as atividades da catalase e GSH-Px em células de epitélio brônquico de pacientes asmáticos, em uso ou não de corticóide inalatório e controles, assim como não houve diferença na expressão do RNAm que codifica as enzimas catalase e glutathiona peroxidase entre controles e asmáticos.

As drogas utilizadas no controle da asma e sua influência na GSH-Px foram pesquisadas. BURGESS et al. (1994) estudaram o comportamento do selênio e atividade GSH-Px plasmáticos em asmáticos após administração de fenoterol, salbutamol e brometo de ipratropium e não observaram alterações. POWELL et al. (1994) não verificaram efeito dos esteróides inalatórios na atividade GSH-Px em hemácias de crianças com asma. FENECH & ELLUL-MICALLEF (1998) estudaram a concentração de selênio plasmático e

GSH-Px e SOD em eritrócitos de asmáticos. Estes autores não constatarem diferença significativa na concentração de selênio e GSH-Px entre asmáticos e controles. No entanto, a atividade da SOD foi menor nos asmáticos, tanto leves quanto graves. Os mesmos parâmetros foram estudados após quatro semanas de tratamento com beclometasona inalatória em um grupo e após duas semanas com prednisolona oral no outro grupo de asmáticos. A beclometasona não exerceu efeito no perfil antioxidante, enquanto a prednisolona aumentou a concentração de selênio no plasma. PENNING et al. (1999) não observaram alteração das atividades de SOD, GSH-Px e glutathione S-transferase eritrocitárias durante tratamento de asmáticos com dipropionato de beclometasona.

HASSELMARK et al. (1993) suplementaram a dieta de asmáticos com selenito de sódio e observaram aumento significativo tanto do selênio sérico como da atividade glutathione peroxidase plaquetária. Estes autores associaram a melhora da relação selênio/GSH-Px com uma evolução clínica mais favorável.

As atividades de outras enzimas antioxidantes têm sido estudadas de forma concomitante à GSH-Px, no sentido de melhor caracterizar a relação radicais do oxigênio/antioxidantes no processo inflamatório da asma. FILIP et al. (1999) determinaram as atividades da SOD, catalase, GSH-Px e os índices CAT(catalase)/SOD e GSH-Px/SOD no sangue de asmáticos. Estes autores observaram aumento das atividades da CAT e GSH-Px e diminuição da atividade da SOD nos pacientes asmáticos. TEKIN et al. (2000) encontraram atividade média de SOD menor em eritrócitos de asmáticos leves do que nos controles. Entretanto, não houve diferença significativa nas atividades de catalase e GSH-Px entre pacientes e controles.

1.7. Justificativa do Trabalho

Apesar do grande interesse no estudo dos radicais livres e dos mecanismos antioxidantes e da associação destes com a asma, não há estudos simultâneos sobre a regulação do sistema NADPH oxidase e GSH-Px celular em granulócitos e células mononucleares de pacientes asmáticos na faixa etária pediátrica. Não há, também, relatos na literatura sobre a associação do conteúdo de citocromo b_{558} e asma.

A realização simultânea dos ensaios sobre atividade NADPH oxidase e conteúdo de citocromo b_{558} e GSH-Px celular contribuirão para análise comparativa entre mecanismos oxidantes e antioxidantes nos granulócitos e células mononucleares de crianças com asma, segundo a gravidade da doença, além de permitir estabelecer a correlação específica entre atividade e conteúdo enzimático do sistema NADPH oxidase nestas mesmas células. (CONDINO-NETO, WHITNEY, NEWBURGER, 1996; CONDINO-NETO, WHITNEY, NEWBURGER, 1998; CONDINO-NETO et al., 1997; CONDINO-NETO & NEWBURGER, 1998).

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Investigar aspectos bioquímicos do sistema NADPH oxidase e glutathione peroxidase celular de granulócitos e células mononucleares de crianças asmáticas, segundo a gravidade da doença.

3. METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Casuística e Protocolo Clínico

Foram incluídos neste estudo 66 crianças e adolescentes, entre seis e 16 anos de idade (média 10,8 anos); 34 femininos e 32 masculinos; 37 caucasóides e 29 negróides; com asma atópica atendidos no Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, no período de março de 1998 a agosto de 2000, que preencheram os seguintes critérios de inclusão (“GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA” - GINA-NIH, 1997; CONDINO-NETO et al., 1991):

1. História episódica ou presença de sintomas de obstrução do fluxo aéreo tais como: tosse, chiado, sibilância, respiração curta ou aperto no peito.
2. Obstrução reversível do fluxo aéreo, espirometricamente caracterizada:
 - VEF_1 (volume expiratório forçado em 1 segundo) $< 80\%$ do previsto; VEF_1/CVF (capacidade vital forçada) $< 65\%$ ou abaixo do limite inferior de normalidade segundo sexo, peso e idade.
 - Aumento $\geq 12\%$ ou pelo menos 200 ml da VEF_1 , após inalação com agonista β_2 -adrenérgico.
3. Caracterização do estado atópico por critérios clínicos e laboratoriais como:
 - Relação causa-efeito positiva entre exposição a determinados antígenos e desencadeamento dos sintomas de asma.
 - Exames laboratoriais compatíveis como: testes cutâneos ou dosagem de IgE específica (RAST ou similar) positivos para antígenos específicos, eosinofilia (excluindo doenças parasitárias), IgE sérica total elevada.

- Concomitância não-obrigatória com doenças alérgicas como: rinite, urticária, dermatite atópica e conjuntivite alérgica.
- Antecedentes familiares positivos para asma (presença de asma em parentes de primeiro grau).

Os pacientes foram submetidos a anamnese, exame físico, espirometria, teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos comuns – ácaros, epitélio de cão e gato, poeira doméstica e barata e outros testes laboratoriais e radiológicos.

Dos 66 pacientes, 36 (55%) apresentaram antecedente familiar positivo e 58 pacientes (88%) apresentaram teste cutâneo de hipersensibilidade imediata positivo. A IgE sérica total média foi de 1223,37 UI/ml (normal < 120 UI/ml).

Segundo os critérios do GINA-NIH, 1997 (151), os pacientes foram classificados em quatro grupos de gravidade de asma:

CLASSIFICAÇÃO DA ASMA SEGUNDO A GRAVIDADE

	Dias com sintomas	Noites com sintomas	PFE OU VEF₁*	Variabilidade do PFE
Persistente grave	Contínuo	Frequente	≤ 60%	> 30%
Persistente moderado	Diário	≥ 5/ mês	60% - 80%	> 30%
Persistente leve	3-6/ semana	3-4/ mês	≥ 80%	20% - 30%
Intermitente leve	≤ 2/ semana	≤ 2/ mês	≥ 80%	< 20%

*Percentual dos valores previstos para VEF₁ e PFE (pico de fluxo expiratório) segundo idade, sexo e peso.

Realizamos também comparação da liberação de superóxido por células mononucleares e granulócitos entre crianças asmáticas (n=29), classificadas de acordo com

sua função pulmonar, sendo o VEF_1 o parâmetro utilizado, obtido no dia do experimento e indivíduos saudáveis, assintomáticos e com $VEF_1 > 80\%$ ($n=24$). Os pacientes foram agrupados por faixas de função pulmonar: grupo 1 - $VEF_1 > 80\%$ ($n=15$); grupo 2 - VEF_1 entre 60 e 80% ($n=9$) e grupo 3 - $VEF_1 < 60\%$ ($n=5$).

3.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos os pacientes que fizeram uso de corticosteróides sistêmicos, anti-inflamatórios não hormonais, aminofilina e antileucotrienos nos últimos 30 dias; os que tiveram infecções virais, bacterianas ou fúngicas nos últimos 30 dias; que fizeram uso de hemoderivados nos últimos 30 dias; tabagistas; portadores de doenças concomitantes como imunodeficiências primária ou secundária, fibrose cística, deficiência de α_1 -antitripsina, presença de corpos estranhos em vias aéreas, anéis vasculares e outras doenças obstrutivas crônicas.

3.3. Adultos Saudáveis

Foram selecionados 40 voluntários adultos saudáveis, não atópicos, não fumantes e que não fazem uso regular de quaisquer medicamentos, com idade média de 30,4 anos. Amostras de sangue destes voluntários foram utilizadas nos testes laboratoriais para efeito de comparação com o grupo de asmáticos.

A escolha do grupo de indivíduos saudáveis constituído por adultos e não por crianças pareadas por idade com os pacientes poderia ser alvo de críticas. Entretanto, a atividade do

“burst” respiratório se desenvolve precocemente na infância (ABRAMSON, WHEELER, QUIE, 1996) e não há dados que sugiram que crianças saudáveis produzam mais reativos intermediários do oxigênio que adultos saudáveis (JÖBIS et al., 1997). FRAZIER et al. (1982) também demonstraram não haver diferença significativa entre a atividade oxidativa de células polimorfonucleares até mesmo quando se compara recém-nascidos a adultos jovens.

3.4. Protocolo Laboratorial

Foram coletadas amostras de sangue venoso dos pacientes e dos voluntários adultos saudáveis (20ml). Neutrófilos e células mononucleares foram fracionados por centrifugação do sangue em Ficoll-Hypaque (BOYUM, 1968). Eritrócitos contaminantes foram removidos por lise hipotônica. Após contagem e cálculo da viabilidade celular, a suspensão de células foi ajustada para 2×10^7 células/ml em solução de Hanks, sem cálcio, magnésio ou vermelho de fenol. Os leucócitos foram utilizados para os ensaios de atividade do sistema NADPH oxidase, quantificação do citocromo b_{558} e atividade da GSX-Px celular.

3.4.1. Atividade do Sistema NADPH Oxidase

A liberação de O_2^- por granulócitos e células mononucleares foi determinada pelo ensaio da redução do citocromo *c*, especificamente inibida pela SOD (superóxido dismutase) (McCORD & FRIDOVICH, 1969; DIAS-DA-MOTA et al., 1996), sendo estudada de duas formas: espontânea (leucócitos incubados apenas em solução de Hanks) e estimulada (leucócitos incubados com PMA – forbol miristato acetato 30nM). Metade dos

tubos continham SOD (60U/ml) no início da reação, e foram controle para a redução inespecífica do citocromo *c*. A absorbância da reação foi medida a 550nm nos tempos: 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos. A quantidade de superóxido liberado foi calculada aplicando-se o coeficiente de extinção de $21.100\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados (nmol de superóxido/ 10^6 células/tempo de incubação) foram expressos pela diferença de absorbância dos tubos contendo SOD ou não.

3.4.2. Conteúdo de Citocromo b_{558}

O citocromo b_{558} dos granulócitos e células mononucleares foi quantificado por espectroscopia de varredura (DING & NATHAN, 1988). No dia do experimento, 10^7 granulócitos ou células mononucleares foram isolados, lavados três vezes em solução de Hanks, sem cálcio, magnésio ou vermelho de fenol, lisados em tampão KH_2PO_4 (0,1 M, pH 7.25), contendo Triton X-100 a 2% (30 minutos, 2°C). O lisado foi centrifugado ($27000 \times g$, 30 minutos, 4°C) e o sobrenadante submetido a espectroscopia de varredura (400-600 nm, 750 nm/min). Para tanto, o espectro (400-600 nm) de uma amostra (1 ml) foi armazenado na memória do espectrofotômetro. Após a adição de grânulos de ditionito de sódio na mesma cuveta, o espectro (400-600 nm) foi redeterminado e a diferença representada numa curva, onde o citocromo b_{558} foi estimado pela altura da banda α (558 nm), utilizando o coeficiente de extinção de $21,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e sendo expresso em $\text{pmol}/10^7$ células (DING & NATHAN, 1988).

3.4.3. Atividade da Glutathione Peroxidase Celular

A atividade da GSH-Px celular foi determinada pelo princípio da reação acoplada da peroxidase-redutase (BEUTLER, 1984), adaptado por SPEIER, BAKER, NEWBURGER (1985). Granulócitos ou células mononucleares (10^6) foram incubados, durante 5 a 10 minutos, na presença de Triton X-100 (0,05%), 0,2 mmol/l de GSH, 1 U/ml de GSH redutase, em solução de Hanks, pH 7,4. A oxidação do NADPH pelo t-butil hidroxiperoxido (adicionado somente na amostra), foi monitorizada espectrofotometricamente a 340nm ($340 = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), nos tempos 0 e 1 minuto. Os resultados foram expressos como nmoles NADPH oxidado/minuto/ 10^6 células (SHEN et al., 1994; NEWBURGER et al., 1994).

3.5. Análise Estatística

Análise de Variância (ANOVA) foi realizada para comparar a liberação de superóxido entre os grupos (classificação do GINA-NIH, 1997) para cada tipo de célula e cada reação, com medidas repetidas para experimento fatorial (MILIKEN & JOHNSON, 1984; MONTGOMERY, 1991). A análise de variância foi realizada separadamente para cada tipo de célula e reação (granulócitos espontâneos e estimulados e mononucleares espontâneos e estimulados). O teste de comparação múltipla de médias utilizado foi o teste de Duncan, que compara todos os pares de médias dos grupos. Foram utilizados também os testes de comparação múltipla de Bonferroni e teste de Dunnett (CONOVER, 1971), o

primeiro para verificar se houve diferença entre os grupos em cada tempo e o segundo para comparar o grupo de indivíduos sadios com os demais grupos.

Para comparar a liberação de superóxido entre os pacientes agrupados por faixas de função pulmonar: grupo 1 - $VEF_1 > 80\%$; grupo 2 - VEF_1 entre 60 e 80% e grupo 3 - $VEF_1 < 60\%$ e o grupo de indivíduos sadios, assintomáticos e com $VEF_1 > 80\%$, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas, devido à liberação de O_2^- ter sido acompanhada em cada indivíduo nos seis tempos diferentes. Para verificar as diferenças entre os grupos foi utilizado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey (MILIKEN & JOHNSON, 1984).

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (SIEGAL, 1975) foi utilizado para comparar o conteúdo de citocromo b_{558} de granulócitos e células mononucleares entre os cinco grupos. Foi considerado o nível de 5% de significância, ou seja, $p < 0,05$. Devido ao pequeno número de medidas do grupo APG, os pacientes foram agrupados em uma única categoria APM/APG.

Utilizamos o teste de Wilcoxon (CONOVER, 1971a) para amostras relacionadas para comparar a GSH-Px celular de granulócitos com células mononucleares num mesmo grupo. Comparamos a atividade GSH-Px entre os grupos através do teste de Kruskal-Wallis (CONOVER, 1971b), que compara os postos das observações em cada grupo.

Foi considerado o intervalo de confiança de 95%, nível de 5% de significância, ou seja, $p < 0,05$, em todos os testes.

3.6. Aspectos Éticos

O presente estudo foi submetido à avaliação da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com parecer favorável.

Foi obtido consentimento pós-informação verbal e por escrito de todos os responsáveis pelos pacientes.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ATIVIDADE DO SISTEMA NADPH OXIDASE

Estudamos a liberação de superóxido por granulócitos e células mononucleares, de forma espontânea e estimulada por PMA (30 nM), em 44 crianças com asma atópica e em 28 indivíduos saudáveis. Segundo os critérios do GINA-NIH (1997), os pacientes foram classificados em portadores de asma: intermitente leve-AIL (n=11), persistente leve-APL (n=15), persistente moderada-APM (n=12) e persistente grave-APG (n=6). Estes resultados estão representados nas Figuras de 1 a 4.

Para comparar a liberação de superóxido entre os grupos para cada tipo de célula e cada reação, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas para experimento fatorial (MILIKEN & JOHNSON, 1984; MONTGOMERY, 1991). A análise de variância foi realizada separadamente para cada tipo de célula e reação (granulócitos espontâneos e estimulados e mononucleares espontâneos e estimulados). O teste de comparação múltipla de médias utilizado foi o teste de Duncan (MONTGOMERY, 1991), que compara todos os pares de médias dos grupos. Foi considerado o intervalo de confiança de 95%, nível de 5% de significância, ou seja, $p < 0,05$. Foram utilizados também os testes de comparação múltipla de Bonferroni (MILIKEN & JOHNSON, 1984) e teste de Dunnett (MONTGOMERY, 1991), o primeiro para verificar se houve diferença entre os grupos em cada tempo e o segundo para comparar o grupo de indivíduos saudáveis com os demais grupos.

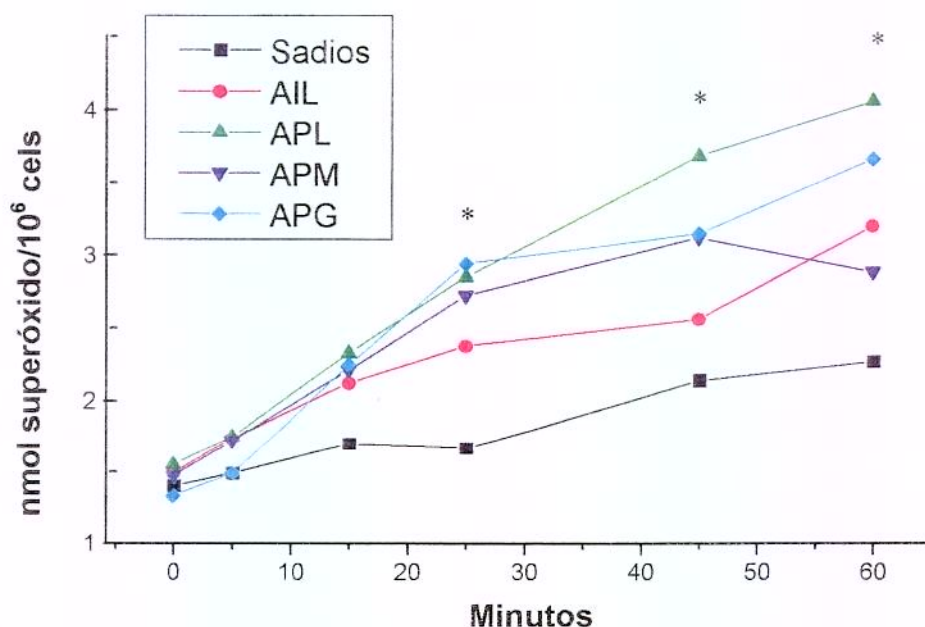


FIGURA 1: Liberação espontânea de superóxido, nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos, por granulócitos de crianças e adolescentes com asma comparada a de indivíduos sadios. * - tempos nos quais $p < 0,05$ (teste de Duncan).

Esta figura representa a média da liberação espontânea do superóxido em nmol de superóxido/ 10^6 granulócitos/tempo de pacientes agrupados segundo a gravidade da doença (asma intermitente leve-AIL, $n=11$; asma persistente leve-APL, $n=15$; asma persistente moderada-APM, $n=12$ e asma persistente grave-APG, $n=6$) e de indivíduos sadios ($n=28$) nos tempos indicados (0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos). No tempo 25 minutos a liberação de superóxido pelos granulócitos dos grupos APL, APM e APG foi significativamente maior que no grupo de indivíduos sadios e no grupo AIL ($p < 0,05$, teste de Duncan). A liberação espontânea de superóxido pelos granulócitos dos grupos APL foi significativamente maior em relação aos sadios e ao grupo AIL nos tempos 45 e 60 minutos ($p < 0,05$, em todas situações, teste de Duncan).

Não houve diferença na liberação de superóxido pelos granulócitos de asmáticos do grupo AIL e dos indivíduos sadios em todos os tempos ($p > 0,05$, em todas as situações, teste de Duncan).

4. Resultados

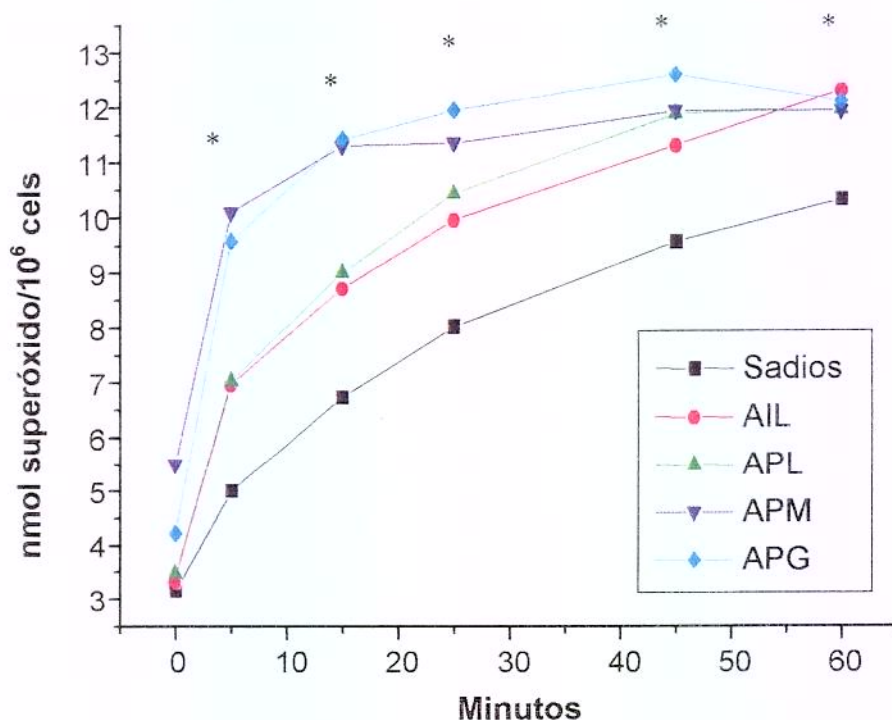


FIGURA 2: Liberação de superóxido, nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos, por granulócitos estimulados com PMA (30 nM) de crianças e adolescentes com asma comparada a de indivíduos sádios. * - tempos nos quais $p < 0,05$ (teste de Duncan).

A média de liberação de superóxido pelos granulócitos de pacientes asmáticos, estimulados com PMA, foi significativamente maior nos grupos APM ($n=12$) e APG ($n=6$) do que no grupo de indivíduos sádios ($n=28$) ($p < 0,05$, em todos os tempos e situações, teste de Duncan).

Utilizando-se o teste de Dunnett para comparação dos indivíduos sádios com os demais, verificou-se liberação de superóxido significativamente maior nos grupos APL (tempo 45 minutos, $n=15$), APM (tempos 5, 15, 25 e 45 minutos, $n=12$), APG (tempos 15, 25 e 45 minutos, $n=6$) do que no grupo de indivíduos sádios ($n=28$).

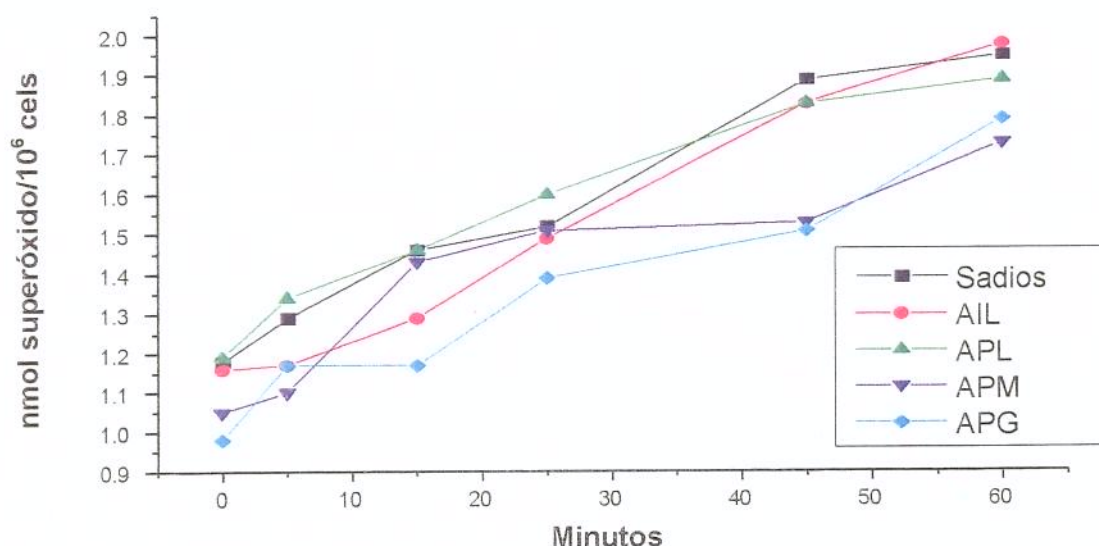


FIGURA 3: Liberação espontânea de superóxido, nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos, por células mononucleares de crianças e adolescentes com asma comparada à de indivíduos sádios.

Não houve diferença significativa nas médias de liberação espontânea de superóxido por células mononucleares entre os diferentes grupos de pacientes asmáticos (AIL, $n=10$; APL, $n=14$; APM, $n=11$ e APG, $n=6$) e os indivíduos sádios ($n=27$) ($p > 0,05$, em todos os tempos e situações, teste de Duncan).

Também não houve diferença significativa na liberação espontânea de superóxido por células mononucleares nos grupos de asmáticos entre si ($p > 0,05$, em todos os tempos e situações, teste de Duncan).

O teste de comparação múltipla de Bonferroni foi utilizado para verificar diferença entre os grupos em cada tempo. No entanto, em nenhum dos tempos houve diferença significativa entre a liberação de superóxido pelas células mononucleares dos cinco grupos. Para comparar o grupo de sádios com os demais grupos, foi utilizado o teste de Dunnett e também não foi encontrada diferença significativa.

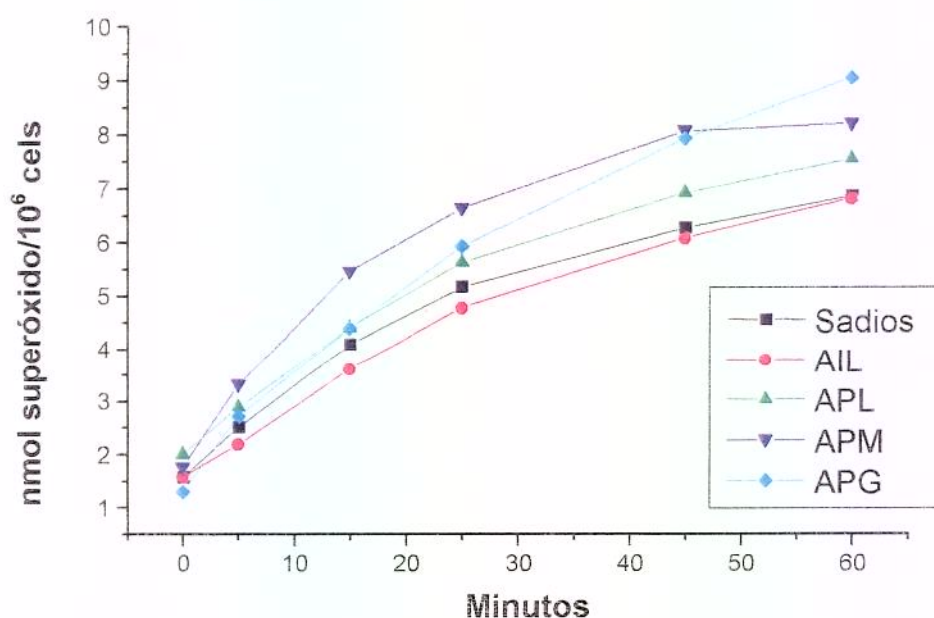


FIGURA 4: Liberação de superóxido, nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos, por células mononucleares estimuladas com PMA (30 nM) de crianças e adolescentes com asma e indivíduos sadios.

Não houve diferença significativa nas médias de liberação de superóxido por células mononucleares estimuladas com PMA (30 nM) entre os diferentes grupos de pacientes (AIL, n=11; APL, n=14; APM, n=12 e APG, n=6) e os indivíduos sadios (n=28) ($p > 0,05$, em todos os tempos e situações, teste de Duncan).

Também não houve diferença significativa na liberação de superóxido por células mononucleares estimuladas com PMA (30nM) entre os grupos de asmáticos ($p > 0,05$, em todos os tempos e situações, teste de Duncan).

Por meio do teste de comparação múltipla de Bonferroni, que verifica diferenças entre os grupos em cada tempo, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos em nenhum tempo. Pelo teste de Dunnett também não houve diferença significativa entre o grupo controle e os demais.

Apresentaremos a seguir, nas Figuras 5 a 8, a análise estatística da comparação da liberação de superóxido por células mononucleares e granulócitos entre crianças asmáticas ($n=29$), classificadas de acordo com sua função pulmonar, sendo o VEF_1 o parâmetro utilizado, obtido no dia do experimento e indivíduos saudáveis, assintomáticos e com $VEF_1 > 80\%$ ($n=24$). Os pacientes foram agrupados por faixas de função pulmonar: grupo 1 - $VEF_1 > 80\%$ ($n=15$); grupo 2 - VEF_1 entre 60 e 80% ($n=9$) e grupo 3 - $VEF_1 < 60\%$ ($n=5$).

Para comparar a liberação de superóxido entre os grupos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) (MILIKEN & JOHNSON, 1984; MONTGOMERY, 1991) com medidas repetidas, devido à liberação ser investigada em cada indivíduo nos seis tempos diferentes. Para verificar as diferenças entre os grupos foi utilizado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey (MONTGOMERY, 1991).

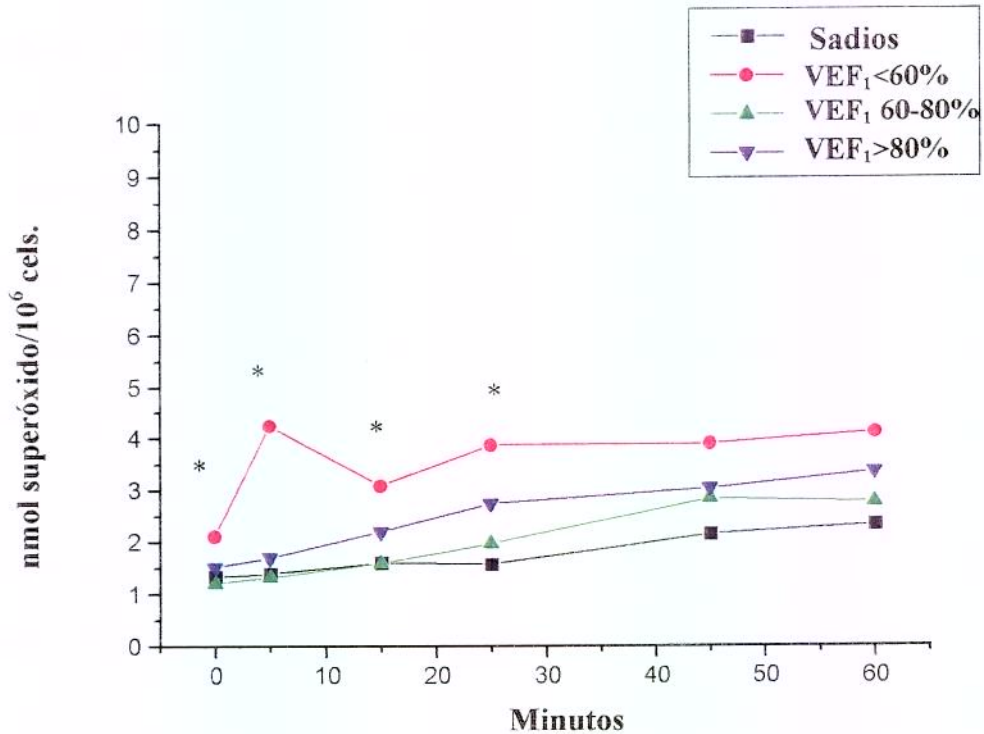


FIGURA 5: Liberação espontânea de superóxido, nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos, por granulócitos de crianças com asma comparada a de indivíduos sadios.

* - tempos nos quais $p < 0,05$, teste de Tukey.

A Fig. 5 representa a média da liberação espontânea de superóxido (nmol de superóxido/10⁶ granulócitos/tempo) nos pacientes com asma agrupados segundo seu VEF₁ obtido no dia do experimento (grupo VEF₁ > 80%, n=15; grupo VEF₁ 60-80%, n=9 e grupo VEF₁ < 60%, n=5) e de indivíduos sadios e com VEF₁ > 80%, nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos.

No tempo 0 a liberação espontânea de superóxido pelos granulócitos do grupo VEF₁ < 60% foi significativamente maior do que no grupo de indivíduos sadios e no grupo 2 ($p < 0,05$, teste de Tukey). No tempo 5 minutos, os granulócitos do grupo VEF₁ < 60%

liberaram mais superóxido do que os grupos $VEF_1 > 80\%$ e VEF_1 60-80% e indivíduos saudáveis ($p < 0,05$, teste de Tukey). Nos tempos 15 e 25 minutos, os granulócitos do grupo $VEF_1 < 60\%$ apresentaram liberação espontânea de superóxido significativamente maior que os do grupo VEF_1 60-80% e indivíduos saudáveis ($p < 0,05$, teste de Tukey).

4. Resultados

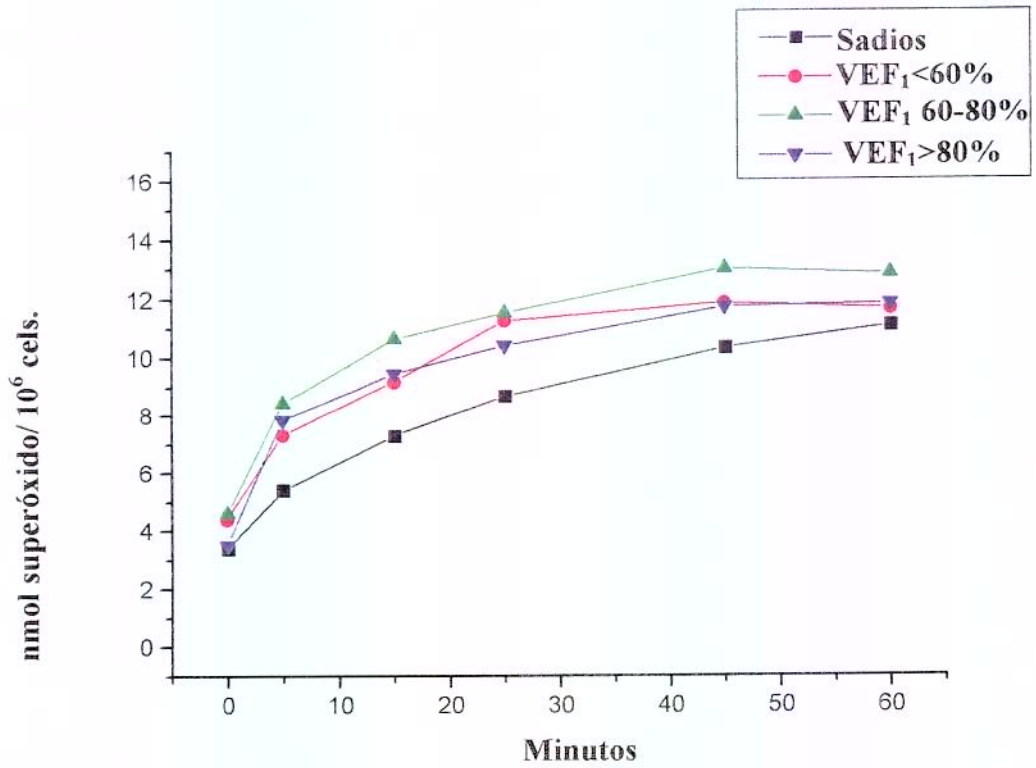


FIGURA 6: Liberação de superóxido, nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos, por granulócitos estimulados com PMA (30 nM) de crianças e adolescentes com asma comparada à de indivíduos sadios.

A Fig. 6 não mostra diferença significativa ao comparar a liberação de superóxido por granulócitos estimulados com PMA (30 nM) dos diferentes grupos de pacientes (grupo VEF₁ > 80%, n=15; grupo VEF₁ 60-80%, n=9 e grupo VEF₁ < 60%, n=5) com os dos indivíduos sadios e com VEF₁ > 80% (n=24) ($p > 0,05$, em todos os tempos, teste de Tukey).

Também não houve diferença ao comparar a liberação de superóxido por granulócitos estimulados com PMA (30 nM) entre os grupos de asmáticos ($p > 0,05$, teste de Tukey).

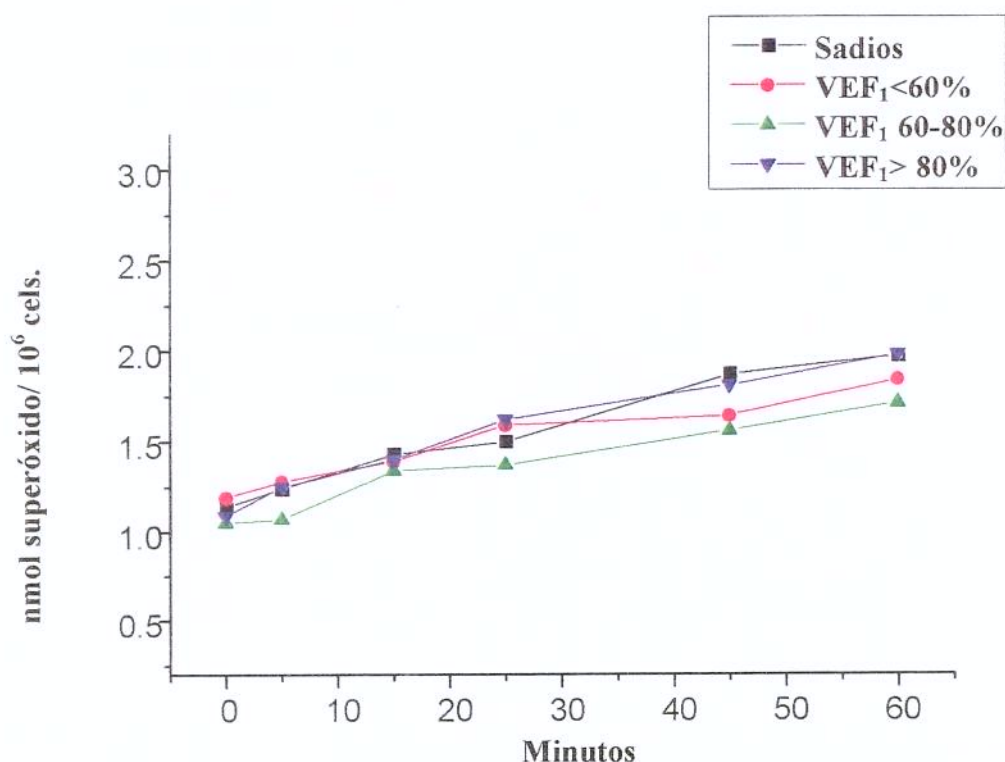


FIGURA 7: Liberação espontânea de superóxido, nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos, por células mononucleares de crianças e adolescentes com asma comparada à de indivíduos sadios.

A Fig. 7 não mostra diferença significativa ao comparar a liberação de superóxido por células mononucleares dos diferentes grupos de pacientes asmáticos (grupo VEF₁ > 80%, n=15; grupo VEF₁ 60-80%, n=9 e grupo VEF₁ < 60%, n=5) com os dos indivíduos sadios e com VEF₁ > 80% (n=24) ($p > 0,05$, teste de Tukey).

Também não houve diferença na liberação espontânea de superóxido por células mononucleares nos grupos de asmáticos entre si ($p > 0,05$, teste de Tukey).

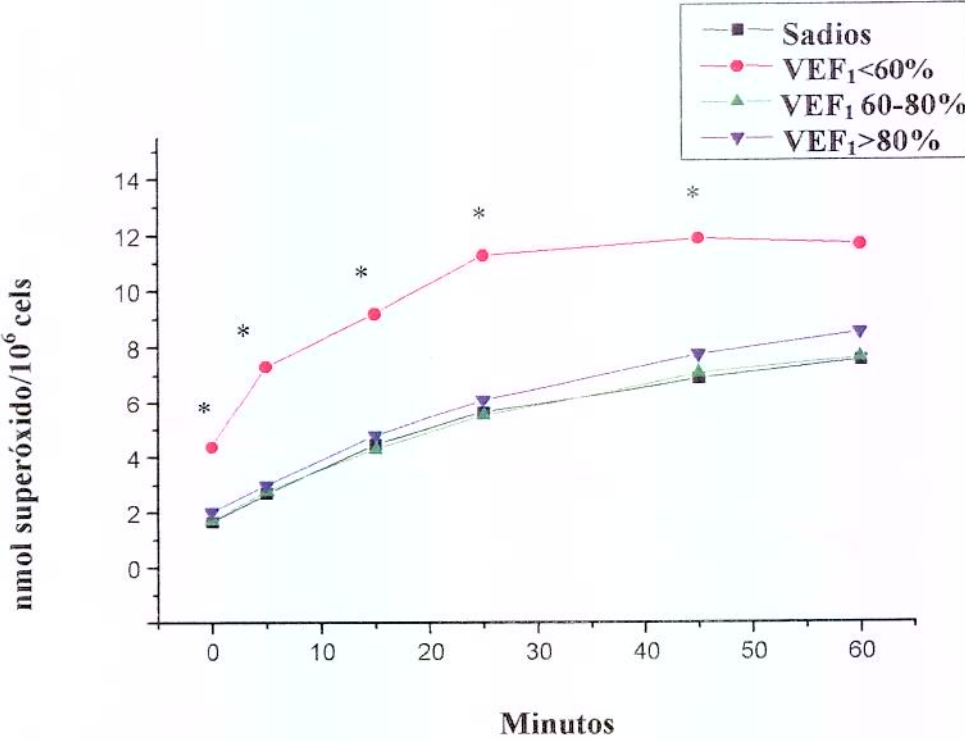


FIGURA 8: Liberação de superóxido, nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos, por células mononucleares estimuladas com PMA (30 nM) de crianças e adolescentes com asma comparada à de indivíduos sadios.

* - tempos nos quais $p < 0,05$, teste de Tukey.

Nos tempos 0 e 45 minutos, as células mononucleares estimuladas com PMA (30 nM) do grupo VEF₁<60% apresentaram liberação de superóxido significativamente maior do que as de indivíduos sadios e com VEF₁>80% ($p < 0,05$, teste de Tukey).

Nos tempos 5, 15 e 25 minutos, as células mononucleares estimuladas com PMA (30 nM) do grupo VEF₁<60% apresentaram liberação de superóxido significativamente maior do que as de indivíduos sadios e as dos grupos VEF₁>80% e VEF₁ 60-80% ($p < 0,05$, teste de Tukey).

4. 2. CITOCROMO b_{558}

Apresentaremos a seguir, nas Figuras 9 e 10, os resultados referentes à quantificação de citocromo b_{558} em granulócitos e células mononucleares de crianças e adolescentes com asma (n=25), agrupadas segundo a gravidade da doença, e de indivíduos saudáveis (n=8). Para comparar o citocromo b_{558} entre os cinco grupos, utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (SIEGAL, 1975). Foi considerado o nível de 5% de significância, ou seja, $p < 0,05$. Devido ao pequeno número de medidas do grupo APG, os pacientes foram agrupados em uma única categoria APM/APG.

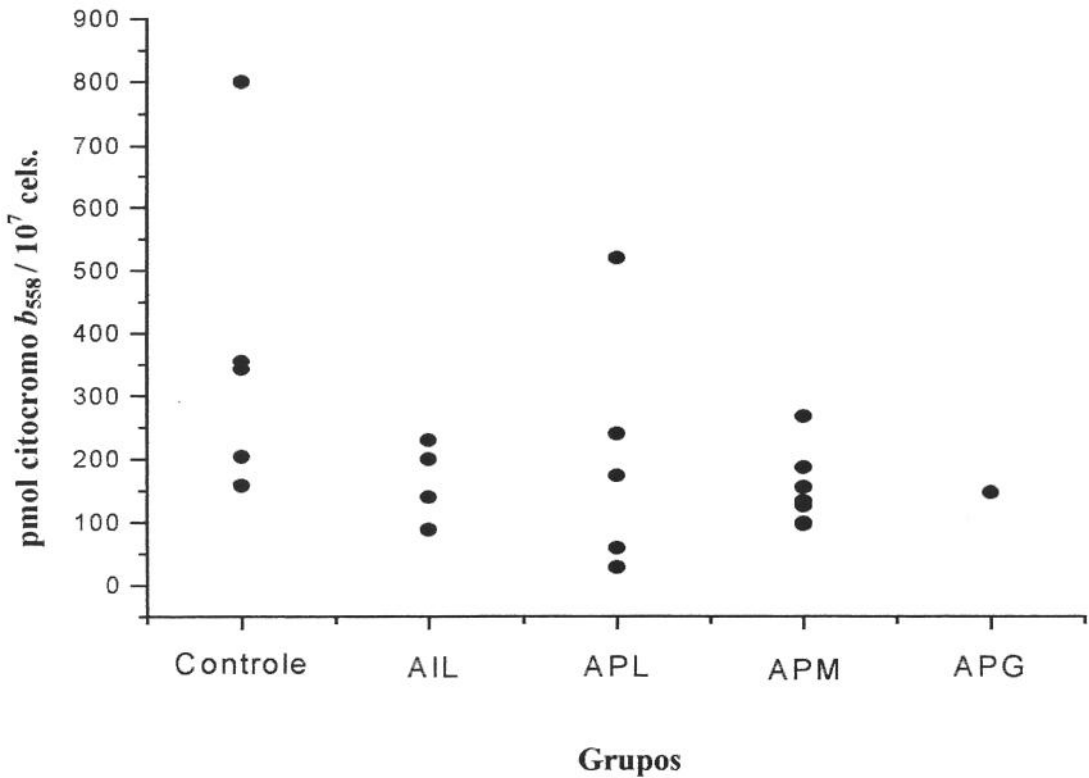


FIGURA 9: Quantificação de citocromo b_{558} em células mononucleares de crianças e adolescentes com asma comparada à de indivíduos saudáveis.

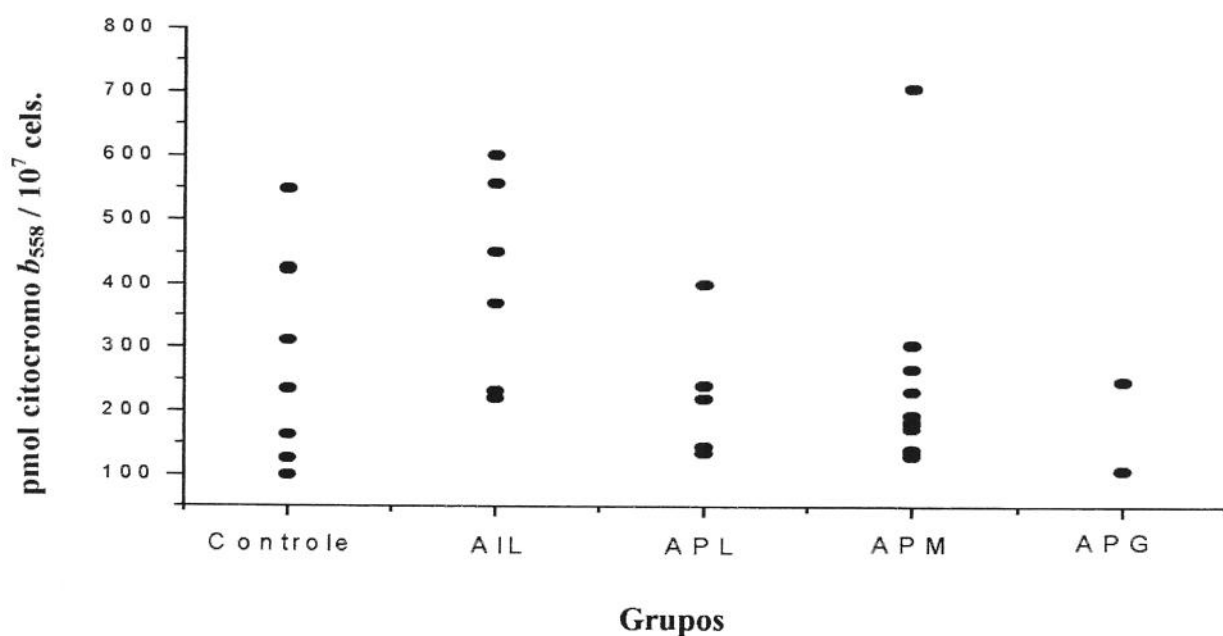


FIGURA 10: Quantificação do citocromo b_{558} em granulócitos de crianças e adolescentes com asma comparada à de indivíduos sadios.

Não houve diferença significativa na dosagem de citocromo b_{558} das células mononucleares entre os grupos de asmáticos: AIL ($n=4$), APL ($n=5$), APM ($n=8$) e APG ($n=1$) e o grupo de indivíduos sadios ($n=5$) ($p = 0,1116$, teste de Kruskal-Wallis).

Não houve diferença significativa na dosagem de citocromo b_{558} dos granulócitos entre os grupos de asmáticos: AIL ($n=6$), APL ($n=6$), APM ($n=11$) e APG ($n=2$) e o grupo de indivíduos sadios ($n=7$) ($p = 0,1098$, teste de Kruskal-Wallis).

4. 3. ATIVIDADE GLUTATIONA PEROXIDASE CELULAR

A atividade GSP-Px de granulócitos e células mononucleares foi comparada entre pacientes asmáticos (n=21), classificados em APL (n=13), APM e APG, sendo que estes últimos grupos foram analisados em conjunto, uma vez que juntos totalizaram n=8 e indivíduos sadios (n=10). Não foram estudados pacientes com asma intermitente.

Para comparar a atividade GSH-Px entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (SIEGAL, 1975), que compara os postos das observações em cada grupo.

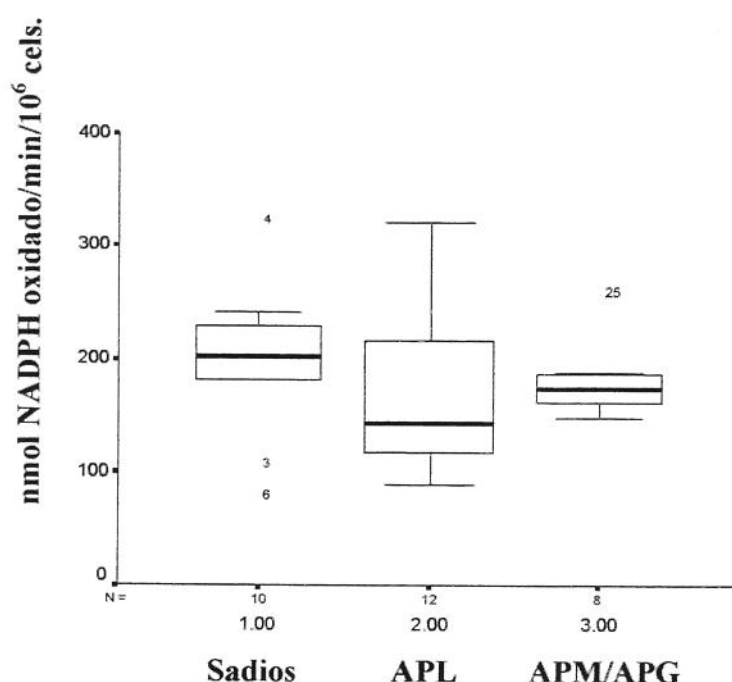


FIGURA 11: Box plotts construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da atividade glutathione peroxidase (nmol NADPH oxidado/min/ 10^6 células) de células mononucleares de crianças e adolescentes com asma comparada à de indivíduos sadios.

Não houve diferença significativa na atividade glutathione peroxidase de células mononucleares entre os diferentes grupos de pacientes asmáticos (APL, $n=12$ e APM/APG, $n=8$) e os indivíduos sadios ($n=10$) ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis).

Também não houve diferença significativa na atividade glutathione peroxidase de células mononucleares entre os grupos de asmáticos ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis).

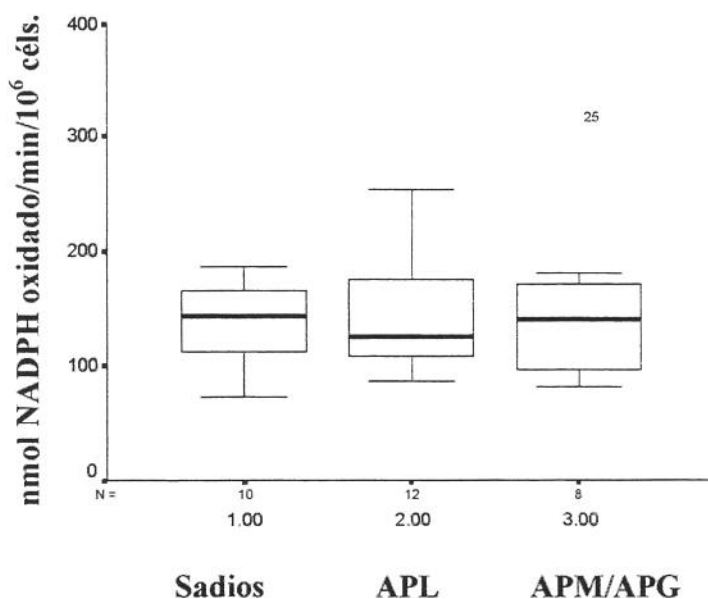


FIGURA 12: Box plotts construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da atividade glutathione peroxidase (nmol NADPH oxidado/min/10⁶ células) de granulócitos de crianças e adolescentes com asma comparada à de indivíduos sadios.

Não houve diferença significativa na atividade glutathione peroxidase de granulócitos entre os diferentes grupos de pacientes asmáticos (APL, n=13 e APM/APG, n=8) e os indivíduos sadios (n=10) ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis).

Também não houve diferença significativa na atividade glutathione peroxidase de granulócitos entre os grupos de asmáticos ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis).

Por meio do teste de Wilcoxon para amostras relacionadas (CONOVER, 1971a), comparamos a atividade glutathiona peroxidase das células mononucleares com a dos granulócitos, em cada grupo.

No grupo dos indivíduos sadios, verificamos que a atividade GSH-PX foi significativamente maior nas células mononucleares ($p < 0,05$, teste de Wilcoxon).

Nos grupos APL e APM/APG encontramos uma tendência da atividade GSH-PX ser maior nas células mononucleares do que nos granulócitos, no entanto esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$, teste de Wilcoxon).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A asma é uma desordem complexa associada com infiltração eosinofílica e ativação de linfócitos T nas vias aéreas. É a doença crônica mais comum na faixa etária pediátrica e conta com um aumento real do número de indivíduos afetados nas últimas cinco décadas. Apesar disso, os mecanismos fisiopatológicos desta afecção e os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da asma num determinado indivíduo não são completamente conhecidos (HAMID & MINSHALL, 2000).

Estudos demonstram que células inflamatórias de pulmões e sangue periférico de indivíduos asmáticos liberam mais radicais livres sob a forma de reativos intermediários do oxigênio do que células de indivíduos normais (CLUZEL et al., 1987; VACHIER et al., 1992; SEDGWICK et al., 1990). Estes estudos sugerem que reativos intermediários do oxigênio produzidos pelas células inflamatórias contribuem para as alterações das vias aéreas associadas com a asma (SANDERS et al., 1995).

Os radicais livres têm sido avaliados no lavado broncoalveolar para o conhecimento de seu papel no câncer de pulmão, síndrome da angústia respiratória do adulto, doenças pulmonares intersticiais, injúria pulmonar induzida pelo tabaco, hiperóxia, toxicidade pulmonar induzida por droga e asma. Existem evidências que sugerem que estes agentes têm um importante papel na injúria pulmonar (ALVAREZ-SALA et al., 1999), aspecto importante na manutenção do processo inflamatório crônico das vias aéreas.

Antioxidantes são substâncias fisiológicas que protegem o organismo contra o dano provocado pelas reações químicas iniciadas pelos reativos intermediários do oxigênio (KERR et al., 1996). Embora o pulmão tenha vários sistemas antioxidantes (SOD, catalase,

glutathiona peroxidase) que previnem ou minimizam os efeitos danosos dos reativos intermediários de oxigênio (JARJOUR & CALHOUN, 1994), a geração em excesso destes radicais e conseqüente peroxidação lipídica em processos inflamatórios crônicos, como o que ocorre na asma, levam à liberação desregulada de neurotransmissores, leucotrienos, tromboxanos e fator ativador de plaquetas. Estes mediadores são capazes de provocar contração do músculo liso das vias aéreas e podem ser liberados por mastócitos e células pulmonares basofílicas após exposição antigênica (SHIVEDOVA et al., 1995).

Os propósitos deste estudo foram identificar o desbalanço entre mecanismos oxidantes (radicais livres) e antioxidantes na patogênese da asma em crianças e adolescentes e corrigi-lo à gravidade do quadro clínico desta patologia.

5. 1. ATIVIDADE NADPH OXIDASE

Observamos que nos pacientes asmáticos com sintomatologia persistente ocorre maior liberação espontânea ou estimulada de ânion superóxido por granulócitos quando comparada à de indivíduos saudáveis ou portadores de asma intermitente. Estes resultados demonstram a implicação da injúria tissular secundária à produção exacerbada deste radical livre nos pacientes com sintomas freqüentes no período intercrítico, mesmo naqueles classificados como persistentes leves. Estes dados são concordantes com os demonstrados por KATO et al. (1991). Eles observaram que polimorfonucleares do sangue periférico de crianças asmáticas, quando estimulados por zimosan opsonizado, PMA ou N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, produzem mais superóxido do que os de controles saudáveis, e

que esta produção é ainda maior durante a crise aguda, o que sugere que a inflamação das vias aéreas causada pelo superóxido pode estar intimamente relacionada com a hiperreatividade brônquica dos indivíduos asmáticos.

Apesar de não termos encontrado diferença estatisticamente significativa na liberação espontânea ou estimulada de ânion superóxido por granulócitos de pacientes com asma intermitente leve quando comparados aos indivíduos saudáveis, notamos uma tendência à maior liberação de superóxido por granulócitos dos pacientes, sugerindo ocorrer maior atividade do sistema NADPH oxidase mesmo em pacientes oligossintomáticos, o que talvez indique que células inflamatórias de indivíduos atópicos mantenham-se excitadas em circulação, mesmo no período intercrítico.

VARGAS et al. (1998) observaram aumento significativo da quimioluminescência de granulócitos de sangue periférico estimulados por PMA de pacientes asmáticos, tanto em crise, como no período intercrítico. Os achados destes autores também sugerem que granulócitos de asmáticos em crise ou no período intercrítico parecem estar num estado hiperreativo e com alta taxa metabólica quando comparados ao grupo controle.

Em nosso estudo, observamos ainda que a liberação espontânea de superóxido por granulócitos do grupo de pacientes persistentes leves, nos tempos 45 e 60 minutos, exibiu tendência a ser superior aos pacientes persistentes moderados e graves (vide Fig. 1 - pág. 32), o que supostamente atribuímos ao fato destes últimos estarem submetidos a terapia com corticosteróides inalatórios com doses superiores às utilizadas no grupo de persistentes leves, uma vez que os corticosteróides inalatórios, como demonstrado por MAJORI et al. (1998), são capazes de diminuir a liberação de superóxido, tanto quanto a corticoterapia

oral ou endovenosa.

Não encontramos diferença na liberação de superóxido por células mononucleares, estimuladas por PMA ou não, quando classificamos os asmáticos de acordo com os critérios do GINA-NIH, 1997. SANDERS et al. (1995) também evidenciaram maior liberação de oxidantes por granulócitos de pacientes alérgicos, após estimulação antigênica do que por células mononucleares, avaliando no entanto células do lavado broncoalveolar. No entanto, MAJORI et al. (1998), estudando também células de sangue periférico, encontraram maior produção de superóxido por monócitos de pacientes com asma não controlada ou não tratada do que nos pacientes com asma controlada.

Estudos têm sido desenvolvidos no sentido de correlacionar o aumento da liberação de superóxido e a hiperreatividade brônquica. NEIJINS et al. (1984) obtiveram correlação positiva entre liberação de superóxido e histamina a partir de leucócitos totais do sangue periférico, com o grau de hiperreatividade brônquica em pacientes asmáticos. TSAI, KAO, HAN (1999) encontraram correlação significativa entre o grau de hiperresponsividade à metacolina e aumento do número de eosinófilos com a atividade NADPH oxidase, estando o número de eosinófilos ativados relacionado também com IgE alérgeno-específica. Estes autores observaram ainda um aumento do número de eosinófilos ativados e de leucócitos com atividade NADPH oxidase aumentada nos pacientes com asma instável, quando comparados com pacientes asmáticos estáveis, o que reflete não apenas a hiperresponsividade das vias aéreas, como também a gravidade da asma destes pacientes.

Além de comparar a liberação de superóxido por granulócitos e células mononucleares de indivíduos sadios e crianças asmáticas agrupadas de acordo com a

classificação do GINA-NIH (1997), correlacionamos também a liberação deste radical livre pelos leucócitos destes pacientes, classificados de acordo com o parâmetro VEF_1 de sua função pulmonar, obtida no dia do experimento.

Observamos maior liberação espontânea de superóxido por granulócitos de crianças e adolescentes asmáticos com maior comprometimento da função pulmonar, quando comparada à de indivíduos saudáveis. No entanto, constatamos que células mononucleares estimuladas com PMA de pacientes asmáticos com $VEF_1 < 60\%$ também liberam mais superóxido do que os indivíduos saudáveis e asmáticos com obstrução leve ($VEF_1 > 80\%$) ou moderada (VEF_1 entre 60 e 80%). É interessante ressaltarmos que este achado apenas foi observado quando correlacionamos a liberação de superóxido por células mononucleares com parâmetros espirométricos, já que quando analisamos esta atividade enzimática de acordo com os critérios do GINA-NIH (1997), não encontramos diferença significativa entre pacientes asmáticos e indivíduos saudáveis.

Supomos que uma possível explicação para estes resultados deva-se ao fato de que os critérios utilizados pela classificação sugerida pelo GINA-NIH (1997) não refletem necessariamente, a presença de obstrução brônquica no momento da obtenção das células do sangue periférico, e sim o histórico do paciente (frequência de sintomas, sintomas noturnos, intensidade das crises, medicações na crise e no período intercrítico e valores basais da função pulmonar). A medida do VEF_1 obtida no dia do experimento, por sua vez, correlaciona-se à gravidade dos sintomas e avalia a obstrução brônquica no momento da coleta.

JARJOUR & CALHOUN (1994) observaram associação semelhante entre a produção espontânea de superóxido por leucócitos recuperados das vias aéreas de adultos

asmáticos com $VEF_1 < 80\%$. Estes autores também correlacionaram sintomas noturnos de asma com aumento da liberação de superóxido por leucócitos totais do espaço aéreo e queda do fluxo expiratório (JARJOUR, BUSSE, CALHOUN, 1992).

KANAZAWA et al. (1991) observaram maior liberação de superóxido por granulócitos do sangue periférico de asmáticos em relação aos controles saudáveis. Eles observaram uma correlação positiva entre tempo e gravidade da doença e liberação de superóxido e uma correlação inversamente proporcional entre VEF_1 e superóxido. Estes achados sugerem que reativos intermediários do oxigênio podem ter papel direto ou indireto na modulação da inflamação e na obstrução das vias aéreas.

5. 2. CONTEÚDO DE CITOCROMO b_{558}

Quanto ao conteúdo de citocromo b_{558} , não encontramos diferença significativa nas dosagens desta flavoproteína em granulócitos ou células mononucleares, entre os diversos grupos de crianças com asma e os indivíduos saudáveis.

A atividade da NADPH oxidase, um sistema enzimático com múltiplos componentes, não se correlaciona estritamente com o conteúdo de um único componente. Apesar da regulação do sistema NADPH oxidase ser um evento, em parte, transcripcional, mecanismos pós-transcripcionais (mobilização de cálcio, fosforilação protéica, ativação da proteína G e ativação da fosfolipase A2) podem contribuir para a ativação deste sistema aumentando as diferenças entre o conteúdo de citocromo b_{558} e a atividade da NADPH oxidase (CONDINO-NETO, WHITNEY, NEWBURGER, 1998). Estas observações podem explicar a ausência de diferença estatisticamente significativa entre as dosagens de

citocromo b_{558} nas crianças com asma e indivíduos saudáveis.

Os nossos resultados indicam que o aumento da atividade do sistema NADPH oxidase nos pacientes com asma não se correlaciona com aumento do conteúdo de citocromo b_{558} e sugerem que outros mecanismos sejam responsáveis pela grande liberação de superóxido nestes pacientes. Não encontramos na literatura outros trabalhos que correlacionem o papel do citocromo b_{558} com a fisiopatologia da asma.

5. 3. GLUTATIONA PEROXIDASE CELULAR

RAHMAN et al. (1996) observaram haver correlação entre tabagismo, exacerbações de doença pulmonar obstrutiva crônica e crises agudas de asma com redução da capacidade antioxidante do plasma destes pacientes. A GSH-Px representa um importante mecanismo de defesa celular contra a injúria oxidativa.

À semelhança do que STONE et al. (1989) encontraram, após comparar a GSH-Px em plaquetas e sangue total de asmáticos com controles, não obtivemos diferença estatisticamente significativa desta atividade enzimática em granulócitos e células mononucleares entre os grupos de crianças com asma e indivíduos saudáveis.

Existe, no entanto, controvérsia na literatura e resultados conflitantes nos estudos publicados. MISSO et al. (1996), por exemplo, identificaram redução progressiva da atividade GSH-Px plaquetária e do sangue total, respectivamente em controles saudáveis, asmáticos não atópicos e asmáticos atópicos, sendo que foi maior a probabilidade de ocorrer sintomas de asma nos indivíduos com baixa atividade GSH-Px plaquetária. Este mesmo grupo observou que eosinófilos de asmáticos ou de controles saudáveis expressam

maior atividade GSH-Px do que neutrófilos (MISSO et al, 1998).

BIBI et al. (1988) estudaram a atividade GSH-Px em eritrócitos de crianças asmáticas e demonstraram menor atividade GSH-Px em pacientes durante crise de asma do que nos controles. Estes autores demonstraram haver correlação entre a gravidade da asma e a atividade GSH-PX; os pacientes com sintomas mais graves exibiram menor atividade desta enzima do que aqueles com sintomas leves, embora estes últimos também tenham apresentado menor atividade enzimática quando comparados aos controles. Os achados destes autores sugerem que a baixa atividade GSH-Px possa ter importância na patogênese da asma.

Nós encontramos menor atividade GSH-Px nos granulócitos do que nas células mononucleares dos indivíduos sadios e uma tendência para menor atividade GSH-Px nos granulócitos do que nas células mononucleares nos pacientes com asma, o que pode estar relacionado ao fato de termos encontrado maior liberação de superóxido pelos granulócitos do que pelas células mononucleares.

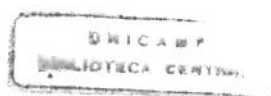
A atividade glutathiona peroxidase em fagócitos relacionada ao processo inflamatório asmático permanece pouco estudada na literatura. Os resultados obtidos no presente estudo, no entanto, não demonstraram diferença na atividade GSH-Px em granulócitos e células mononucleares nos pacientes com asma quando comparados a indivíduos sadios e nem correlação entre a atividade desta enzima com a gravidade da doença.

Este é um achado surpreendente, uma vez que um aumento desta atividade enzimática seria esperado como resposta protetora à maior liberação de reativos intermediários do oxigênio por células inflamatórias envolvidas na asma, o que poderia

estar também implicado na patogênese dos sinais e sintomas da asma.

Foi possível demonstrar que a avaliação da liberação de superóxido por leucócitos do sangue periférico pode ser um parâmetro que correlaciona o processo inflamatório da asma com a gravidade da doença, uma vez que os granulócitos de pacientes com quadro clínico mais exacerbado apresentam maior liberação de superóxido do que os de pacientes com formas mais leves e os de indivíduos saudáveis. Estes achados sugerem a possível utilização deste método pouco invasivo como monitorização indireta da inflamação e injúria pulmonar, podendo também ser objeto de modulação farmacológica.

6. CONCLUSÕES



6. CONCLUSÕES

Nas crianças asmáticas com sintomatologia persistente (segundo a classificação do GINA-NIH, 1997) ocorre maior liberação espontânea ou estimulada de ânion superóxido por granulócitos quando comparada à de indivíduos saudáveis ou portadores de asma intermitente. Não encontramos diferença na liberação de superóxido por células mononucleares, estimuladas com PMA ou não.

Observamos que ocorre maior liberação espontânea de superóxido por granulócitos de crianças asmáticas com maior comprometimento da função pulmonar quando comparada à de indivíduos saudáveis. No entanto, observamos que células mononucleares estimuladas com PMA de crianças com asma com $VEF_1 < 60\%$ também liberam mais superóxido do que os indivíduos saudáveis e asmáticos com obstrução leve ($VEF_1 > 80\%$) ou moderada (VEF_1 entre 60 e 80%).

Os resultados obtidos neste estudo são concordantes com os da literatura e mostram que granulócitos de pacientes asmáticos apresentam maior liberação de superóxido, espontânea ou estimulada, tanto quando utilizamos parâmetros clínicos como espirométricos. O mesmo ocorreu com as células mononucleares, sendo que desta vez apenas quando utilizamos os parâmetros espirométricos.

Não encontramos diferença significativa nas dosagens de citocromo b_{558} em granulócitos e células mononucleares entre os diversos grupos de crianças com asma e os indivíduos saudáveis.

Não observamos diferença significativa na atividade glutathione peroxidase em granulócitos e células mononucleares entre os grupos de pacientes com asma e indivíduos

sadios. No entanto, encontramos aumento significativo na GSH-Px em células mononucleares em relação à GSH-Px granulocítica dos indivíduos sadios e tendência a maior atividade GSH-Px em células mononucleares do que em granulócitos de pacientes com asma.

Foi possível demonstrar que a avaliação da produção de superóxido por células do sangue periférico pode ser um parâmetro que correlaciona o processo inflamatório na asma com a gravidade da doença, uma vez que os granulócitos de pacientes com quadro clínico mais exacerbado apresentam maior liberação de superóxido que os de pacientes com formas mais leves e ou os de indivíduos sadios. Estes achados sugerem a possível utilização deste método pouco invasivo como monitorização da inflamação e injúria pulmonar.

7. SUMMARY

7. SUMMARY

NADPH oxidase activity and glutathione-peroxidase activity in granulocytes and mononuclear cells of asthmatic children according to the disease severity.

The aim of this work was to investigate the NADPH activity and glutathione-peroxidase activity in peripheral blood granulocytes and mononuclear cells from asthmatic children classified according to GINA/NIH (1997) criteria. We selected 66 patients (six to 16 years of age) and 40 healthy individuals. Blood samples from patients and healthy controls were collected and leukocytes were isolated for the evaluation of superoxide release, cytochrome b_{558} and cellular glutathione-peroxidase activity. The results were compared to those obtained from healthy controls by analysis of variance and Kruskal-Wallis test. The release of superoxide by granulocytes was significantly higher in the patients with persistent symptoms compared to healthy individuals or patients with intermittent symptoms ($p < 0.05$). Mononuclear cells stimulated by PMA also released more superoxide in asthmatic children with $FEV_1 < 60\%$ than in healthy controls and patients with milder obstruction ($FEV_1 > 60\%$) ($p < 0.05$). There was no significant difference in the cytochrome b_{558} measurement nor in the cellular GSH-Px activity in granulocytes or mononuclear cells, among groups of patients and healthy individuals. We conclude that superoxide release by peripheral blood cells can be a parameter that correlates the inflammatory process in asthma and the disease severity. Pharmacological modulation should focus on this pathological finding.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, W.M. – Reactive oxygen species. In: BARNES, P.J.; GRUNSTEIN, M.M.; LEFF, A.R.; WOOLCOCK, A.J. – **Asthma**. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 627-38.
- ABRAMSON, J.S.; WHEELER, J.G.; QUIE, P.G. – The polymorphonuclear leukocyte system. In: STIEHM, E.R. – **Immunologic disorders in infants and children**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1996. p. 94-112.
- ALVAREZ-SALA, R.; GOMEZ DE TERREROS CARO, F.J.; PRADOS SANCHEZ, C.; VILLAMOR LEON, J. – Free radicals in the bronchoalveolar lavage. **An. Med. Interna** **16**: 473-6, 1999.
- ANTCZAK, A.; NOWAK, D.; SHARIATI, B.; KROL, M.; PIASECKA, G.; KURMANOWSKA, Z. – Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. **Eur. Resp. J.**, **10**: 1235-41, 1997.
- BABIOR, B.M.; CURNUTTE, J.T.; KIPNES, R.S. – Pyridine-nucleotide-dependent superoxide production by a cell-free system from human granulocytes. **J. Clin. Invest.**, **56**: 1035-42, 1975.
- BABIOR, B.M. – Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. Part I. **N. Engl. J. Med.**, **298**: 659-68, 1978.
- BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. – Biological defense mechanisms: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.**, **52**: 741-4, 1973.
- BABIOR, B.M.; KUPER, R.; CURNUTTE, J.T. – Kinetics of activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. **J. Biol. Chem.**, **263**: 1713-8, 1988.
- BAEHNER, R.L.; BOXER, L.A.; ALLEN, J.M.; DAVIS, J. – Autooxidation as a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, **50**: 327-5, 1977.
- BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S.L. – Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J. Clin. Invest.**, **84**: 1045-9, 1989.
- BAKER, S.S.; COHEN, H.J. – Increased sensitivity to H₂O₂ in glutathione peroxidase deficient rat granulocytes. **J. Nutr.**, **114**: 2003-9, 1984.

- BAKER, R.D.; BAKER, S.S.; LaROSA, K.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P.E. – Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep3B. **Arch. Biochem. Biophys.**, **304**: 53-7, 1993.
- BALDRIDGE, C.W.; GERARD, R.W. – The extrarespiration of phagocytosis. **Am. J. Physiol.**, **103**: 235-6, 1933.
- BARNES, P.J. – Reactive oxygen species and airway inflammation. **Free Radic. Biol. Med.**, **9**: 235-43, 1990.
- BASS, H.; MOSMANN, T.; STROBER, S. – Evidence for mouse Th1- and Th2-like helper T cells *in vivo*. Selective reduction of Th1-like cells after total lymphoid irradiation. **J. Exp. Med.**, **170**: 1495-511, 1989.
- BEASLEY, R.; THOMPSON, C.; PEARCE, N. – Selenium, glutathione peroxidase and asthma. **Clin. Exp. Allergy**, **21**(2): 157-9, 1991.
- BECKER, E.L.; SIGMAN, M.; OLIVER, J.M. – Superoxide production induced in rabbit polymorphonuclear leukocytes by synthetic chemotactic peptides and A23187. **Am. J. Pathol.**, **95**: 81-97, 1979.
- BEUTLER, E. – Glutathione peroxidase. In: **Red Cell Metabolism**. Orlando, Anonymous Grune & Stratton, 1984. p.74-6.
- BIBI, H.; SCHLESINGER, M.; TABACHNIK, E.; SCHWARTZ, Y.; ISCOVITZ, H.; IAINA, A. – Erythrocyte glutathione peroxidase activity in asthmatic children. **Ann. Allergy** **61**: 339-40, 1988.
- BIERMAN, C.W.; PEARLMAN, D.S.; SHAPIRO, G.G.; BUSSE, W.W. – Asthma. In: BIERMAN, C.W. - **Allergy, Asthma and Immunology from Infancy to Adulthood**. Seattle, W B Saunders Co. 1996. p. 546-70.
- BORISH, L.; ROSENWASSER, L. – Th₁/Th₂ lymphocytes: Doubt some more. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **99**: 161-4, 1997.
- BOXER, L.A. – The role of antioxidants in modulating neutrophil functional responses. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **262**: 19-34, 1990.
- BOYUM, A. – Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **21**(Suppl 97): 1-77, 1968.
- BURGESS, C. D.; BREMNER, P.; THOMPSON, C.D.; CRANE, J.; SIEBERS, R.W.; BEASLEY, R. - Nebulized beta 2-adrenoceptor agonists do not affect plasma selenium or glutathione peroxidase activity in patients with asthma. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, **32**:290-292, 1994.

- BURK, R.F.; HILL, K.E. – Regulation of selenoproteins. **Annu. Rev. Nutr.**, **13**: 65-81, 1993.
- BURNHAM, D.N.; TYAGI, S.R.; UHLINGER, D.J.; LAMBETH, J.D. – Diacylglycerol generation and phosphoinositide turnover in human neutrophils effects of particulate versus soluble stimuli. **Arch. Biochem. Biophys.**, **269**: 345-63, 1989.
- BURROWS, B.; MARTINEZ, F.D.; HALONEN, M.; BARBEE, R.A.; CLINE, M.G. – Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. **N. Engl. J. Med.**, **320**: 271-7, 1989.
- BUSSE, W.W.; REED, C.E. – Asthma: definition and pathogenesis. In: MIDDLETON, E.; REED, C. E.; ELLIS, E. F.; ADKINSON, N. F.; YUNGINGER, J. W.; BUSSE, W. W., editors - **Allergy Principles and Practice**. Saint Louis, Mosby, 1993. p. 1173-201.
- CALAFAT, J.; KUIJPERS, T.W.; JANSSEN, H.; BORREGAARD, N.; VERHOEVEN, A.J.; ROOS, D. – Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b₅₅₈ and the adhesion molecule CD11b/CD18. **Blood**, **81**: 3122-9, 1993.
- CALHOUN, W.J.; LAVINS, B.J.; MINKWITZ, M.C.; EVANS, R.; GLEICH, G.J.; COHN, J. - Effect of Zafirlukast (Accolate) on cellular mediators of inflammation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **157**: 1381-9, 1998.
- CHADA, S.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P.E. – Post-transcriptional regulation of glutathione peroxidase gene expression by selenium in the HL-60 human myeloid cell line. **Blood**, **74**: 2535-41, 1989.
- CHAMBERS, I.; FRAMPTON, J.; GOLDFARB, P.; AFFARA, N.; McBAIN, W.; HARISON, P.R. – The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: The selenocysteine in the active site is encoded by the termination codon, TGA. **EMBO J.**, **5**: 1221-7, 1986.
- CHANOCK, S.J.; EL BENNA, J; SMITH, R.M.; BABIOR, B.M. – The respiratory burst oxidase. **J. Biol. Chem.**, **269**: 24519-22, 1994.
- CHEN, F.; CASTRANOVA, V.; SHI, X.; DEMERS, L.M. - New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. **Clin. Chem.**, **45**(1): 7-17, 1999.
- CHIHARA, J.; KAKAZU, T.; HIGASHIMOTO, I.; SAITO, N.; HONDA, K.; TSUDA, A.; KAYABA, H.; KAMADA, Y.; OYAMADA, H.; URAYAMA, O. - RANTES Augments Eosinophil Lucigenin-Dependent Chemiluminescence. **Int Arch. Allergy Immunol**, **117**(suppl 1): 40-3, 1998.

- CHU, F.F.; DOROSHOW, J.H.; ESWORTHY, R.S. – Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. **J. Biol. Biochem.**, **268**: 2571-6, 1993.
- CLEMENT, A.; CHADELAT, K.; MASHAD, J. – A controlled study of oxygen metabolite release by alveolar macrophages from children with interstitial lung disease. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **136**: 1424-8, 1987.
- CLUZEL, M.; DAMON, M.; CHANEZ, P.; BOUSQUET, J.; CRASTES DE PAULET, A.; MICHEL, F.B.; GODARD, P. – Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **80**: 195-201, 1987.
- COHEN, G.P. – Glutathione peroxidase: the primary agent for elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**, **2**: 1420-4, 1963.
- CONDINO-NETO, A.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P.E. – The effect of dexamethasone or indomethacin on cytochrome b expression and superoxide production by human myelomonocytic THP-1 cells differentiated by IFN-gamma and/or TNF-alpha. **Blood**, **88**: 29b (abstr.), 1996.
- CONDINO-NETO, A.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P.E. – Dexamethasone but not indomethacin down-regulates the human NADPH oxidase by inhibiting the expression of genes encoding components of the NADPH oxidase system. **J. Immunol.**, **161**: 4960-7, 1998.
- CONDINO-NETO, A.; RAE, J.; PADDEN, C.; WHITNEY, C.; CURNUTTE, J.T.; NEWBURGER, P.E. – An intronic mutation in CYBB gene leading to RNA instability and variant X-linked chronic granulomatous disease. **Blood**, **90**(Suppl. 1): 136a(abstr.), 1997.
- CONDINO-NETO, A.; NEWBURGER, P.E. – NADPH oxidase activity and cytochrome *b₅₅₈* content of human Epstein-Barr virus transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. **Arch. Biochem. Biophys.**, **360**: 158-64, 1998.
- CONDINO-NETO, A.; VILELA, M.M.S.; CAMBIUCCI, E.C.; RIBEIRO, J.D.; GUGLIELMI, A.A.G.; MAGNA, L.A.; DE NUCCI, G. – Theophylline therapy inhibits neutrophil and mononuclear cell chemotaxis from chronic asthmatic children. **Br. J. Clin. Pharmacol.** **32**: 557-61, 1991.
- SOCIEDADES BRASILEIRAS DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA, PEDIATRIA E PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA - II Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. Epidemiologia. **J. Pneumol.**, **24**: 176-7, 1998.
- CONOVER, W.J. – In: **Practical Nonparametric Statistics**. New York, John Wiley & Sons, 1971a. p.206-16.

- CONOVER, W.J. – In: **Practical Nonparametric Statistics**. New York, John Wiley & Sons, 1971b. p.256-64.
- CROCE, M.; MANSO, E.C.; VASCONCELOS, D.M.; DUARTE, A.J.S. – Linfócitos Th₁, Th₂ e citocinas na asma: papel na etiopatogenia. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, **19**: 252-62, 1997.
- CROSS, A.R.; CURNUTTE, J.T.; RAE, J.; HEYWORTH, P.G. – Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease. **Blood Cells Mol. Dis.**, **22**: 90-5, 1996.
- CURNUTTE, J.T.; BABIOR, B.M.; KARNOVSKY, M.L. – Fluoride-mediated activation of the respiratory burst in human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, **63**: 637-47, 1979.
- CURNUTTE, J.T.; ORKIN, S.H.; DINAUER, M.C. – Genetic disorders of phagocyte function. In: STAMATOYANNOPOULUS, G.; NEINHUIS, A.W.; MAJERUS, P.W.; VARMUS, H. – **The Molecular Basis of Blood Diseases**. Philadelphia, W.B. Saunders, 1994. p. 493-540.
- CURNUTTE, J.T.; SCOTT, P.J.; MAYO, L.A. – Cytosolic components of the respiratory burst oxidase: Resolution of four components, two of which are missing in complementing types of chronic granulomatous disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 825-9, 1989.
- DEAGEN, J.T.; BUTLER, J.A.; ZACHARA, B.A.; WHANGER, P.D. – Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, and albumin in plasma. **Anal. Biochem.**, **208**: 176-81, 1993.
- DE DUVE, C. – A re-examination of the physiological role of peroxisomes. In: DE DUVE, C.; HAYASHI, O. – **Tocopherol, oxygen and biomembranes**. Amsterdam, Elsevier, 1978. p.351-61.
- DEMOLY, P.; VACHIER, I.; PENE, J.; MICHEL, F.B.; GODARD, P.; DAMON, M. – IgE produces monocyte superoxide anion release: correlation with CD23 expression. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **93**: 108-16, 1994.
- DEMOLY, P.; DAMON, M.; MICHEL, F.B.; GODARD, P. – Interferon-gamma activates superoxide anion in blood monocytes from asthmatic patients. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, **75**: 162-6, 1995.
- DE REAVE, H.R.; THUNNISSEN, F.B.; KANEKO, F.T.; GUO, F.H.; LEWIS, M.; KAVURU, M.S.; SECIC, M.; THOMASSEN, M.J.; ERZURUM, S.C. – Decreased Cu, Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correction by inhaled corticosteroid in vivo. **Am. J. Physiol.**, **272**(1 Pt 1): L148-54, 1997.

- DIAS-DA-MOTTA, P.M.; ARRUDA, V.R.; MUSCARA, M.N.; SAAD, S.T.O.; DE NUCCI, G.; COSTA, F.F.; CONDINO-NETO, A. – The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.**, **93**: 333-40, 1996.
- DINAUER, M.C.; PIERCE, E.A.; BRUNS, A.P.; CURNUTTE, J.T.; ORKIN, S.H. – Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-*phox*). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. **J. Clin. Invest.**, **86**: 1729-37, 1990.
- DING, A.H.; NATHAN, C.F. – The measurement of cytochrome *b*₅₅₈ in polymorphonuclear leukocytes and macrophages in the presence of hemoglobin or mitochondrial cytochromes. **Anal. Biochem.**, **175**: 22-9, 1988.
- DIPLOCK, A.T. – Antioxidants and free radical scavengers. In: RICE-EVANS, CA. BURDON, RH, editors - **Free radical damage and its control**. Amsterdam, Elsevier, 1994. p. 113-30.
- DJUKANOVIC, R.; ROCHE, W.R.; WILSON, J.W.; BEASLEY, C.R.W.; TWENTYMAN, O.P.; HOWARTH, P.H.; HOLGATE, S.T. – Mucosal inflammation in asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **142**: 434-57, 1990.
- DORFMAN, L.M.; ADAMS, G.E. – Reactivity of hydroxyl radical in aqueous solutions. **US Dept. Comm. Natl. B. Stds. N.SDRS.NBS-N 46**, 1975.
- EL BENNA, J.; FAUST, L.P.; BARBIOR, B.M. – The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47^{phox} during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. **J. Biol. Chem.**, **269**: 23431-6, 1994.
- ESWORTHY, R.S.; CHU, F.F.; PAXTON, R.J.; AKMAN, S.; DOROSHOW, J.H. – Characterization and partial amino acid sequence of human plasma glutathione peroxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, **286**: 330-6, 1991.
- EZEAMUZIE, C.I.; AL-HAGE, M. - Effects of some anti-asthma drugs on human eosinophil superoxide anions release and degranulation. **Int. Arch. Allergy Immunol**: **115**: 162-8, 1998.
- FENECH, A.G.; ELLUL-MICALLEF, R. - Selenium, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in maltese asthma patients: effect of glucocorticoid administration. **Pulm. Pharmacol. Ther.** **11**: 301-8, 1998.
- FILIP, F.; BRANISTEANU, D.; POPOVICI, I.; JERCA, L.; TOPOLICEANU, F.; MANCAS, G.; SARMASAN, V.; VARTOLOMEI, M.; JERCA, O.; BUSUIOC, D. - The blood enzymatic antioxidative potential in bronchial asthma patients. **Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.**, **103**: 153-7, 1999.

- FLATT, A.; PEARCE, N.; THOMSON, C. D.; SEARS, M. R.; ROBINSON, M. F.; BEASLEY, R. - Reduced selenium in asthmatic subjects in New Zealand. **Thorax**, **45**: 95-9, 1990.
- FLOHE, L. - The glutathione peroxidase reaction: molecular basis of the antioxidant function of selenium in animals. **Curr. Top. Cellular Regulation**, **27**: 473-8, 1985.
- FRAZIER, J.P.; CLEARY, T.G.; PICKERING, L.K.; KOHL, S. ROSS, P.J. - Leukocyte function in healthy neonates following vaginal and cesarian section deliveries. **J. Pediatr.**, **101**: 269-72, 1982.
- FUJISAWA, T.; KEPAHRT, G.M.; GRAY, B.H.; GLEICH, G.J. - The neutrophil and chronic allergic inflammation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **151**: 689-97, 1990.
- GABIG, T.G.; CREAN, C.D.; MANTEL, P.L.; ROSLI, R. - Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. **Blood**, **85**: 804-11, 1995.
- GORSKI, F.; KRAKOWIAK, A.; RUTA, U.; PAZDRAK, K.; PALCZYNSKI, C. - Eosinophil and neutrophil chemiluminescence in patients with atopic asthma and in healthy subjects. **Alergol. Immunopathol.**, **21**: 71-4, 1993.
- HABER, F.; WEISS, J. - The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc. R. Soc. Surg. A.**, **147**: 332-51, 1934.
- HALLIWELL, B. - Drug antioxidant effects: a basis for drug selction? **Drugs**, **42**: 570-605, 1991.
- HALLIWELL, B. - Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence ? **Lancet**, **344**: 721-4, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. - Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. **Lancet**, **23**: 1396-7, 1994.
- HALLIWELL, B. - Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. **Ann. Rheum. Dis.**, **54**: 505-10, 1995.
- HAMID, Q.A.; MINSHALL, E.M. - Molecular pathology of allergic disease. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **105**: 21-36, 2000.
- HANCOCK, J.T. - Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules: their production and role in disease. **Brit. J. Biom. Sci.**, **54**: 38-46, 1997.
- HASSELMARK, L.; MALMGREN, R.; UNGE, G.; ZETTERSTRÖM, O. - Lowered platelet glutathione peroxidase activity in pacients with intrinsec asthma. **Allergy**, **45**: 523-7, 1990.

- HASSELMARK, L.; MALMGREN, R.; ZETTERSTRÖM, O.; UNGE, G. - Selenium supplementation in intrinsic asthma. **Allergy** **48**: 30-6, 1993.
- HENDERSON, L.M.; CHAPPEL, J.B. - NADPH oxidase of neutrophils. **Biochem. Biophys. Acta Bio-Energics**, **1273**: 87-107, 1996.
- HILL, K.E.; LYONS, P.R.; BURK, R.F. - Differential regulation of rat liver selenoprotein MRNAs in selenium deficiency. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **185**: 260-3, 1992.
- HORWITZ, R.J.; BUSSE, W.W. - Inflammation and asthma. **Clinics in Chest Medicine**, **16**: 583-602, 1995.
- IKEDA, Y.; LONG, D.M. - The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. **Neurosurgery**, **27**: 1-11, 1990.
- JARJOUR, N.N.; CALHOUN, W.J. - Enhanced production of oxygen radicals and asthma - **J Lab Clin Med**, **123**: 131-7, 1994.
- JARJOUR, N.N.; BUSSE, W.W.; CALHOUN, W.W. - Enhanced production of oxygen radicals in nocturnal asthma. **Am. Rev Respir Dis.** **146**: 905-11, 1992.
- JESAITIS, A.J.; BUESCHER, E.S.; HARRISON, D.; QUINN, M.T.; PARKOS, C.A.; LIVESEY, S.; LINNER, J. - Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. **J. Clin. Invest.**, **85**: 821-35, 1990.
- JÖBIS, Q.; RAATGEER, H.C.; HERMANS, P.W.M.; JONGSTE, J.C. - Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. **Eur. Respir. J.**, **10**: 519-21, 1997.
- KADRABOVA, J.; MAD'ARIC, A.; KOVACIKOVA, Z.; PODIVINSKY, F.; GLINTER, E.; GAZDIK, F. - Selenium status is decreased in patients with intrinsic asthma. **Biol. Trace. Elem. Res.**, **52 (3)**: 241-8, 1996.
- KANAZAWA, H.; KURIHARA, N.; HIRATA, K.; TAKEDA, T. - The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. **Chest** **100**: 1319-22, 1991.
- KATO, M.; NAKANO, M.; MORIKAWA, A.; KIMURA, H.; KUROUTE, T. - Ability of polymorphonuclear leucocytes to generate active oxygen species in children with bronchial asthma. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **95**: 17-22, 1991.
- KAY, A.B. - Asthma and inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **87**: 893-907, 1991.
- KERR, M.E.; BENDER, C.M.; MONTI, E.J. - An introduction to oxygen free radical. **Heart & Lung**, **25**: 200-9, 1996.

- KJELDSEN, L.; BAINTON, D.F.; SENGELOV, H.; BORREGAARD, N. – Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: Identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunochemistry and subcellular fractionation. **Blood**, **82**: 3183-91, 1993.
- KLEBANOFF, S.J. – Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. **Science**, **169**: 1095-7, 1970.
- KLEBANOFF, S.J.; VADAS, M.A.; HARLAN, J.M.; SPARKS, L.H.; GAMBLE, J.R.; AGOSTI, J.A.; WALTERSDORPH, A.M. – Stimulation of neutrophil by tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, **136**: 4220-5, 1986.
- KNAUS, U.G.; MORRIS, S.; DONG, H.J.; CHERNOFF, J.; BOKOCH, G.M. – Regulation of human leukocytes p21-activated kinases through G protein-coupled receptors. **Science**, **269**: 221-3, 1995.
- KNIGHT, J.A. – Diseases related to oxygen-derived free radicals. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, **25**: 111-21, 1995.
- KOO, C.; LEFKOWITZ, R.J.; SNYDERMAN, R. – The oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocyte membranes exists in two affinity states. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **106**: 442-9, 1982.
- KOO, C.; LEFKOWITZ, R.J.; SNYDERMAN, R. – Guanine nucleotides modulate the binding affinity of the oligopeptide chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.**, **72**: 748-53, 1983.
- KOWNASTZKI, E.; KAPP, A.; UHRICH, S. – Modulation of human neutrophilic granulocyte function by recombinant human lymphotoxin. Promotion of adherence, inhibition of chemotactic migration and superoxide anion release from adherent cells. **Clin. Exp. Immunol.**, **74**: 143-8, 1988.
- LETO, T.L.; LOMAX, K.J.; VOLPP, B.D.; NUNOI, H.; SECHKER, J.M.; NAUSEEF, W.M.; CLARK, R.A.; GALLIN, J.I.; MALECH, H.L. – Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a non-catalytic region of p60c-src. **Science**, **248**: 727-30, 1990.
- LEVANDER, O.A.; DeLOACH, D.P.; MORRIS, V.C.; MOSER, P.B. – Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium status in rats. **J. Nutr.**, **113**: 55-63, 1983.
- LEVANDER, O.A. – The importance of selenium in total parenteral nutrition. **Bull. NY. Acad. Med.**, **60**: 144-55, 1984.
- LEVANDER, O.A.; BURK, R.F. – Report on the 1986 A.S.P.E.N. Research Workshop on selenium in clinical nutrition. **J. Parenter. Enteral. Nutr.**, **10**: 545-9, 1986.

- LINN, W.S.; BUCKLEY, R.D.; SPIER, C.E.; BLESSEY, R.L.; JONES, M.P.; FISCHER, D.A.; HACKNEY, J.D. - Health effects of ozone exposure in asthmatics. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 117(5): 835-43, 1978.
- LOMAX, K.J.; LETO, T.L.; NUNOI, H.; GALLIN, J.I.; MALECH, H.L. - Recombinant 47-Kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. **Science**, 245: 409-12, 1989.
- MAJORI, M.; VACHIER, I.; GODARD, P.; FARCE, M.; BOUSQUET, J.; CHANEZ, P. - Superoxide anion production by monocytes of corticosteroid-treated asthmatic patients. **Eur. Respir. J.**, 11: 133-8, 1998.
- MATSUBARA, T.; ZIFF, M. - Superoxide anion release by human endothelial cell: Synergism between a phorbol ester and a calcium ionophore. **J. Cell. Physiol.**, 127: 207-10, 1986.
- MATSUBARA, T.; ZIFF, M. - Increased superoxide anion release from human endothelial cell in response to cytokines. **J. Immunol.**, 137: 3295-8, 1986b.
- MCCORD, J.; FRIDOVICH, I. - Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, 244: 6044-55, 1969.
- MCCORD, J.M.; GAO, B.; LEFF, J.; FLORES, S.C. - Neutrophil-generated free radicals: possible mechanisms of injury in adult respiratory distress syndrome. **Envir. Health Perspect.**, 102 Suppl 10: 57-60, 1994.
- McPHAIL, L.C.; SNYDERMAN, R. - Activation of respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. Evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. **J. Clin. Invest.**, 72: 192-200, 1983.
- McPHAIL, L.C.; CLAYTON, C.C.; SNYDERMAN, R. - The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. **J. Biol. Chem.**, 259: 5768-75, 1984.
- McPHAIL, L.C.; SHIRLEY, P.S.; CLAYTON, C.C.; SNYDERMAN, R. - Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor. **J. Clin. Invest.**, 75: 1735-9, 1985.
- MEIER, B.; CROSS, A.R.; HANCOCK, J.T.; KAUP, F.J.; JONES, O.T.G. - Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. **Biochem. J.**, 275: 241-5, 1991.
- MELTZER, S.; GOLDBERG, B.; LAD, P.; EASTON, J. - Superoxide generation and its modulation by adenosine in the neutrophils of subjects with asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 83: 960-6, 1989.

- MILIKEN, G.A.; JOHNSON, D.E. – **In Analysis of Messy Data**. Volume I: Designed Experiments. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1984. p. 322-50.
- MILLS, G.C. – Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme wich protects hemoglobin from oxidative breakdown. **J. Biol. Chem.**, **229**: 189-97, 1957.
- MISSE, N.L.; POWERS, K.A.; GILLON, R.L.; STEWART, G.A.; THOMPSON, P.J. - Reduced platelet glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration in atopic asthmatic patients. **Clin. Exp. Allergy**. **26**(7): 838-47, 1996.
- MISSE, N.L.; PERONI, D.J.; WATKINS, D.N.; STEWART, G.A.; THOMPSON, P.J. - Glutathione peroxidase activity and mRNA expression in eosinophils and neutrophils of asthmatics and non-asthmatic subjects. **J. Leukocyte Biol.**, **63**: 124-30, 1998.
- MONTESERÍN, J.; CAMACHO, M.J.; GUTIÉRREZ, D.; LLAMAS, E.; GUARDIA, P.; BONILLA, I.; SÁNCHEZ-MONTESERÍN, H.; CONDE, J. - Neutrophils and allergy. **Allergol. et Immunopathol.**, **24**(5): 193-200, 1996.
- MONTGOMERY, D.C. In: **Design and Analysis of Experiments**. New York, John Wiley & Sons., 3 ed. 1991. p. 50-87.
- MORRISON, J.; HIGENBOTTAN, T. – The molecular genetics of atopy. **N. Engl. J. Med.**, **320**: 271-2, 1989.
- MULLENBACH, G.T.; TABRIZI, A.; IRVINE, B.D.; BELL, G.I.; HALLIWELL, R.A. – Sequence of a cDNA coding for human glutathione peroxidase confirms TGA encodes active site selenocysteine. **Nucleic Acids Res.**, **15**: 5484, 1987.
- NAGATA, M.; SEDGWICK, J.B.; BUSSE, W.W. - Synergistic activation of eosinophil superoxide anion generation by VCAM-1 and GM-CSF. **Int Arch Allergy Immunol**, **114**(suppl 1): 78-80, 1997.
- NATHAN, C.F. – Respiratory burst in adherent human neutrophils: Triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. **Blood**, **73**: 301-6, 1989.
- NEIJNS, H.J.; RAATGEER, R.E.; DEGENHART, H.J.; DUIVERMAN, E.J.; KERREBIJN, K.F. – Altered leukocyte response in reltaion to the basic abnormality in children with asthma and bronchial hyperresponsiveness. **Am. Rev. Respir. Dis.** **130**: 744-7, 1984.
- NEWBURGER, P.E.; EZEKOWITZ, R.A.B.; WHITNEY, C.; WRIGHT, J.; ORKIN, S.H. – Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**: 5215-9, 1988.

- NEWBURGER, P.E.; DAI, Q.; WHITNEY, C. – *In vitro* regulation of human phagocyte cytochrome *b* heavy and light chain gene expression by bacterial lipopolysaccharide and recombinant human cytokines. **J. Biol. Chem.**, **266**: 16171-, 1991.
- NEWBURGER, P.E.; MALAWISTA, S.E.; DINAUER, M.C.; GELBART, T.; WOODMAN, R.C.; CHADA, S.; SHEN, Q.; VAN BLARICON, G.; QUIE, P.G.; CURNUTTE, J.T. – Chronic granulomatous disease and glutathione peroxidase deficiency, revisited. **Blood**, **84**: 3861-9, 1994.
- NUNOI, H.; ROTROSEN, D.; GALLIN, J.I.; MALECH, H.L. – Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. **Science**, **242**: 1298-301, 1988.
- OGRYZLO, E.A. – The nature of singlet oxygen. In: RANBY, B.; RABECK JF - **Singlet oxygen: reactions with organic compounds and polymers**. New York, John Wiley, 1978. p. 4-11.
- PARKOS, C.A.; ALLEN, R.A.; COCHRANE, C.G.; JESAITIS, A.J. – The quaternary structure of the plasma membrane b-type cytochrome of human granulocytes. **Biochem. Biophys. Acta**, **932**: 71-83, 1988.
- PARKOS, C.A.; ALLEN, R.A.; COCHRANE, C.G.; JESAITIS, A.J. – Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides of 91,000 and 22,000 relative molecular weights. **J. Clin. Invest.**, **80**: 732-42, 1987.
- PARKOS, C.A.; DINAUER, M.C.; WALKER, L.E.; ALLEN, R.A.; JESAITIS, A.J.; ORKIN, S.H. – The primary structure and unique expression of the 22 kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**: 3319-23, 1988.
- PEARSON, D.J.; SUAREZ-MENDEZ, V.J.; DAY, J.P.; MILLER, P.F. – Selenium status in relation to reduced glutathione peroxidase activity in aspirin-sensitive asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, **21**: 203-8, 1991.
- PENNINGS, H.J.; BORM, P.J.; EVELO, C.T.; WONTERS, E.F. – Changes in levels of catalase and glutathione in erythrocytes of patients with stable asthma, treated with beclomethasone dipropionate. **Eur. respir. J.**, **13**: 1260-6, 1999.
- PLAZA, V.; PRAT, J.; ROSELLÒ, J.; BALLESTER, E.; RAMIS, I.; MULLOL, J.; GELPÍ, E.; VIVES-CORRONS, J.L.L.; PICADO, C. – In vitro release of arachidonic acid metabolites, glutathione peroxidase, and oxygen-free radicals from platelet of asthmatic patients with and without aspirin intolerance – **Thorax**, **50**: 490-6, 1995.
- POWELL, C.V.E.; NASH, A.A.; POWERS, H.J.; PRIMHAK, R.A. – Antioxidant status in asthma. **Pediatr. Pulmonol**, **18**(1): 34-8, 1994.

- PRYOR, W.A. – The formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo. **Photochem. Photobiol.**, **28**: 787-801, 1978.
- QUIE, P.G. – Chronic granulomatous disease of childhood: A saga of discovery and understanding. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **12**: 395-8, 1993.
- QUINN, M.T.; PARKOS, C.A.; WALKER, L.; ORKIN, S.H.; DINAUER, M.C.; JESAITIS, A.J. – Association of a Ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils. **Nature**, **342**: 198-200, 1989.
- RAHMAN, I.; MORISON, D.; DONALDSON, K.; NACNEE, W. – Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. **Am. J. Crit. Care Med.** **154**: 1055-60, 1996.
- REDDY, A.P.; HSU, B.; REDDY, P.S.; LI, N.; THYAGARAJU, K.; REDDY, C.C.; TAM, M.F. TU, C.D. – Expression of glutathione peroxidase I gene in selenium-deficient rats. **Nucleic Acids Res.**, **16**: 5557-67, 1988.
- RENKEMA, T.E.J.; POSTMA, D.S.; NOORDHOEK, J.A.; FABER, H.; SLUITER, H.J.; KAUFFMAN, H.F. – Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic airflow obstruction. **Agents Actions**, **26**: 52-4, 1989.
- RICHTER, A.M.; ABBOUD, R.J.; JOHAL, S.S.; FERA, T.A. – Acute effect of smoking on superoxide production by pulmonary alveolar macrophages. **Lung**, **164**: 233-42, 1986.
- ROBINSON, J.M.; BADWEY M.L.; KARNOVSKY M.L.; KARNOVSKY M.J. – Release of superoxide and change in morphology by neutrophils in response to phorbol esters: antagonism by inhibitors of calcium-binding proteins. **J. Cell. Biol.**, **101**: 1052-8, 1985.
- ROBINSON, D.S.; HAMID, Q.; YING, S.; TSICOPOULOS, A.; BARKANS, J.; BENTLEY, J. – Predominant Th₂ – like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **N. Engl. J. Med.**, **326**: 298-304, 1992.
- ROOS, D.; DE BOER, M.; KURIBAYASHI, F.; MEISCHL, C.; WEENING, R.S.; SEGAL, A.W.; AHLIN, A.; NEMET, J.; HOSSLE, BERNATOWSKA-MATUSZKIEWICZ, E.; MIDDLETON-PRICE, H. – Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Blood**, **87**: 1663-81, 1996.
- ROSSI, F.; ZATTI, M. – Changes in the metabolic pattern of polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. **Br. J. Exp. Pathol.**, **45**: 548-59, 1964.
- ROYER-POKORA, B.; KUNKEL, L.M.; MONACO, A.P.; GOFF, S.C.; NEWBURGER, P.E.; BAEHNER, R.L.; COLE, F.S.; CURNUTTE, J.T.; ORKIN, S.H. – Cloning the

- gene for an inherited disorder - chronic granulomatous disease - on the basis of its chromosomal location. **Nature** **322**: 32-8, 1986.
- SAEDI, M.S.; SMITH, C.G.; FRAMPTON, J.; CHAMBERS, I.; HARRISON, P.R.; SUNDE, R.A. - Effect of selenium status on mRNA levels for glutathione peroxidase in rat liver. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **153**: 855-61, 1988.
- SALVEMINI, D.; DE NUCCI, G.; SNEDDON, J.M.; VANE, J.R. - Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. **Br. J. Pharmacol.** **97**: 1145-50, 1989.
- SANDERS, S.P.; ZWEIER, J.L.; HARRISON, S.J.; TRUSH, M.A.; REMBISH, S.J.; LIU, M.C. - Spontaneous oxygen radical production at sites of antigen challenge in allergic subjects. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **151**: 1725-33, 1995.
- SCHAUER, U.; LEINHAAS, C.; JAGER, R.; RIEGER, C.H.L. - Enhanced superoxide generation by eosinophils from asthmatic children. **Int. Arch. Allergy Appl. Immun.**, **96**: 317-21, 1991.
- SEDGWICK, J.B.; GEIGER, K.M.; BUSSE, W.W. - Superoxide generation by hypodense eosinophils from patients with asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **142**: 120-5, 1990.
- SEGAL, A.W.; JONES, O.T.G.; WEBSTER, D.; ALLISON, A.C. - Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. **Lancet** **ii**: 446-9, 1978.
- SEGAL, A.W.; ABO, A. - The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends Biochem. Sci.**, **18**: 43-7, 1993.
- SEYBOLD, Z.V.; ABRAHAM, W.M.; GAZEROGLU, H.; WANNER, A. - Impairment of airway mucociliary transport by *Pseudomonas aeruginosa* products. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **146**: 1173-6, 1992.
- SHEN, Q.; CHADA, S.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P.E. - Regulation of the human cellular glutathione peroxidase gene during *in vitro* myeloid and monocytic differentiation. **Blood**, **84**: 3902-8, 1994.
- SHIVEDOVA, A.A.; KISIN, E.R.; KAGAN, V.E.; KAROL, M.H. - Increased lipid peroxidation and decreased antioxidants in lungs of guinea pig following an allergic pulmonary response. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **132**: 72-81, 1995.
- SIEGAL, S. - In: **Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento**. São Paulo, Mc Graw Hill, 1975. p. 209-218.
- SKLAR, L.A. - Ligand-receptor dynamics and signal amplification in the neutrophil. **Adv. Immunol.**, **39**: 95-143, 1986.

- SMITH, L.J.; HOUSTON, M.; JAMES, A. - Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.** **147**: 1461-4, 1993.
- SPEIER, C.; BAKER, S.S.; NEWBURGER, P.E. - Relationships between *in vitro* selenium supply, glutathione peroxidase activity and phagocytic function in the HL-60 human myeloid cell line. **J. Biol. Chem.**, **260**: 8951-5, 1985.
- STONE J.; HINKS, L.J.; BEASLEY, R.; HOLGATE, S.T.; CLAYTON, B.A. - Reduced selenium status of patients with asthma. **Clin. Sci. (Colch)**, **77**: 495-500, 1989.
- SULLIVAN, R.; FREDETTE, J.P.; GRIFFIN, J.D.; LEAVITT, J.L.; SIMONS, E.R.; MELNICK, D.A. - An elevation in the concentration of free cytosolic calcium is sufficient to activate the oxidative burst of granulocytes primed with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J. Biol. Chem.**, **264**: 6302-9, 1989.
- TAPPEL, A.L. - Selenium-glutathione peroxidase: properties and synthesis. **Curr. Top. Cellular Regulation**, **24**: 87-97, 1984.
- TAPPEL, A.L.; HAWKES, W.C.; WIEHLMSEN, E.C.; MOTSENBOCKER, M.A. - Selenocysteine-containing proteins and glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, **107**: 602-19, 1984.
- TAKAHASHI, K.; NEWBURGER, P.E.; COHEN, H.J. - Glutathione peroxidase protein. Absence in selenium deficiency states and correlation with enzymatic activity. **J. Clin. Invest.**, **77**: 1402-4, 1986.
- TAKAHASHI, K.; AKASAKA, M.; YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, C.; MIZOGUSHI, J.; KOYAMA, J. - Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. **J. Biochem. (Tokyo)**, **108**: 145-8, 1990.
- TAUBE, H. - Mechanism of oxidation with oxygen. **J. Gen. Physiol.**, **49**: 28-65, 1965.
- TEKIN, D.; SIN, B. A.; MUNGAN, D.; MISIRLIGIL, Z.; YAVUZER, S. - The antioxidative defense in asthma. **J. Asthma**. **37**: 59-63, 2000.
- TERAMOTO, S.; SHU, C.; OUCHI, Y.; FUKUCHI, Y. - Increased spontaneous production and generation of superoxide anion by blood neutrophils in patients with asthma. **J. Asthma**, **33**: 149-55, 1996.
- TSAI, J.J.; KAO, M.H.; HAN, S.H. - The respiratory burst activity of activated eosinophils in atopic asthmatics. **Int Arch Allergy Immunol**, **119**: 38-44, 1999.

- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES: EXPERT PANEL 2, GLOBAL INICIATIVE FOR ASTHMA (GINA) – Practical guide for the diagnosis and management of asthma. **NIH Publication**, **97**: 4053, 1997.
- VACHIER, I.; DAMON, M.; LE DOUCEN, C.; DE PAULET, A.C.; CHANEZ, P.; MICHEL, F.B. GODARD, P. – Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthmatic patients. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **146**: 1161-6, 1992.
- VARGAS, L.; PATINO, P.J.; MONTOYA, F.; VANEGAS, A.C.; ECHAVARRIA, A.; GARCIA DE OLARTE, D. – A study of granulocyte respiratory burst in patients with allergic bronchial asthma. **Inflammation**, **22**: 45-54, 1998.
- VOLKMAN, D.J.; BUESCHER, E.S.; GALLIN, J.I.; FAUCI, A.S. – B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: superoxide generation in chronic granulomatous disease and granules in Chediak-Higashi syndrome. **J. Immunol.**, **133**: 3006-9, 1984.
- VOLPP, B.D.; NAUSEEF, W.M.; CLARK, R.A. – Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. **Science**, **242**: 1295-7, 1988.
- WARD, K.P.; ARTHUR, J.R.; RUSSEL, G.; AGGET, P.J. – Blood selenium content and glutathione peroxidase activity in children with cystic fibrosis, coeliac disease, asthma, and epilepsy. **Eur. J. Pediatr**, **142**(1): 21-4, 1984.
- WIENJES, F.B.; HSUAN, J.J.; TOTTY, N.F.; SEGAL, A.W. – p40^{phox}, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain *src* homology 3 domains. **Biochem. J.**, **296**: 557-61, 1993.
- WIERENGA, E.; SNOECK, M.; JANSEN, H.; BOS, J.; VAN LIER, R.; KAPSENBERG, M. – Human atopic-specific types 1 and 2 T helper cell clones. **J. Immunol.**, **147**: 2942-9, 1991.
- WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. – Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem. J.**, **313**: 17-29, 1996.
- WOSCHNAGG, C.; RAK, S.; VENGE, P. – Oxygen radical production by blood eosinophils is reduced during birch pollen season in allergic patients. **Clin. Exp. Allergy**, **26**: 1064-72, 1996.
- YOSHIMURA, S.; TAKEKOSHI, S.; WATANABE, K.; FUJII-KURYAMA, Y. – Determination of nucleotide sequence of cDNA coding rat glutathione peroxidase and diminished expression of the mRNA in selenium deficient rat liver. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **154**: 1024-8, 1988.

ZHAN, S.; VAZQUEZ, N.; WIENTJES, F.B.; BUDARF, M.L.; SCHOROCK, E.; RIED, T.; GREEN, E.D.; CHANOCK, S.J. – Genomic struture, chromossomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. **Blood**, **88**: 2714-21, 1996.

9. BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES

9. BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES

HERANI, M.L.G. – Normas para apresentação de dissertações e teses. São Paulo, BIREME, 1991. 45p.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS/UNICAMP - Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Ed. SAD – OF. CIR/PRPG/06/95 – Normas ABNT. 1995.8p.

10. ANEXOS

Declaração de Consentimento Pós-Informação

Projeto de Pesquisa:

Estudo do Sistema NADPH oxidase e da atividade da Glutathion Peroxidase Intracitoplasmática em Neutrófilos e Células Mononucleares de Crianças Asmáticas segundo a gravidade da Doença.

Responsáveis pelo estudo :

Dr. Antônio Condino Neto
Livia Esteves Marçal

Declaro estar ciente que este serviço está fazendo acompanhamento de crianças com asma, com idade de 3 a 14 anos, com coleta de exames laboratoriais para complementação do diagnóstico clínico.

Estou ciente de que será coletada uma amostra de 10 ml de sangue de veia periférica e de que terei que levar meu filho ao hospital para exames médico e laboratoriais (coleta de sangue).

Fui alertada de que o estudo não implicará em nenhum gasto monetário, que todas as informações são sigilosas e também que poderei ser informada dos resultados no momento que eu desejar.

Estou esclarecida que trata-se de um trabalho experimental de investigação que não trará benefícios terapêuticos imediatos para a criança e que meu consentimento não é obrigatório e que a qualquer momento esta autorização poderá ser suspensa.

Dr. Antônio Condino Neto
Livia Esteves Marçal

Mãe do Paciente

HC : -----

Paciente : -----

Endereço : -----

Mãe : -----

Data ____/____/____

Em caso de dúvida ligar:
Comissão de Ética Médica : 3788-7910
Dr. Antônio Condino Neto : 3788-8453



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ (019) 289.3749 ou 7232
(019) 289.3114 fax
✉ barbie@turing.unicamp.br

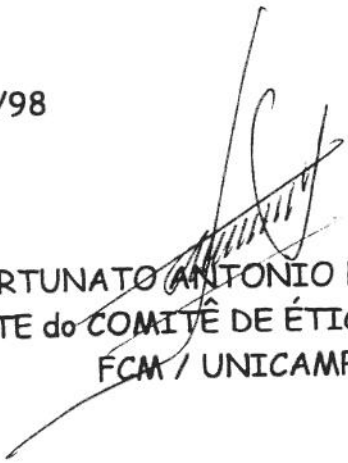
PARECER: N° 056/98

PESQUISA: ESTUDO DO SISTEMA NADPH OXIDASE E DA ATIVIDADE DA
GLUTATION PEROXIDASE INTRACITOPLASMÁTICA EM
NEUTRÓFILOS E CÉLULAS MONONUCLEARES DE CRIANÇAS
ASMÁTICAS SEGUNDO A GRAVIDADE DA DOENÇA

PESQUISADOR: Livia Esteves Marçal

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores, aprova a pesquisa supracitada bem como o Consentimento Pós-Informação por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e 251/97.

CEP/FCM, 25/06/98


Prof. Dr. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP