

Andréa Ferreira Mendes Carmona

Adaptações bioquímicas em fumantes e em  
pacientes portadores de doença pulmonar  
obstrutiva crônica (DPOC)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <i>Andréa Ferreira Mendes Carmona</i>
e aprovada pela Comissão Juizadora. <i>29/07/99</i>

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo  
Departamento de Bioquímica - I.B.  
UNICAMP

Campinas - 1999

Campinas, 29 de julho de 1999.

**Banca Examinadora:**

**Titulares:**

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo  
(IB - UNICAMP - orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha  
(IB - UNICAMP)



Assinatura

Profa. Dra. Ilma Aparecida Paschoal  
(FCM - UNICAMP)



Assinatura

**Suplente:**

Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva  
(IB - UNICAMP)



Assinatura

---

“Qual é o fim da sabedoria? Saber crer.  
Qual é a origem de muitos erros? Querer saber.”

L. Vidart

---

Dedico este trabalho aos meus dois  
amores,

Reinaldo e Vinícius.

## Agradecimentos

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo pela credibilidade, amizade e orientação deste trabalho.

Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva pela amizade e orientações que muito acrescentaram aos meus conhecimentos.

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito pelas contribuições nas análises estatísticas e pelas sugestões no exame de qualificação.

Prof. Dr. José Camillo Novello pela participação e sugestões no exame de qualificação.

Aos funcionários da Coleta do Hemocentro - Unicamp pela ajuda nas coletas das amostras.

A todos os voluntários doadores que participaram deste trabalho.

Aos amigos Cláudio, Léo, Neto, Maria Eugênia, Guilherme, Fernando, Agnes, Leandro e em especial ao Armino e Soraya pelas contribuições e bons momentos.

Ao Daniel pelo apoio técnico.

As secretárias Andréia, Marina e Miriam pela amizade e ajuda nos serviços burocráticos.

A todos os amigos do departamento.

Aos meus pais, em especial, minha mãe por tudo já fez e ainda faz.

Ao Reinaldo pela confiança, estímulo e principalmente paciência.

E ao meu filho Vinícius pelas alegrias e por aceitar minha ausência, mesmo sem entender.

## Abreviações

ADP - adenosina difosfato  
AMP - adenosina monofosfato  
ATP - Adenosina trifosfato  
BHT - butil hidróxi tolueno  
CAT - catalase  
CK - creatina quinase  
DNA - ácido desoxiribonucleico  
DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina  
DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica  
DTNB - ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)  
EROs - espécies reativas de oxigênio  
G6PD - glicose 6-fosfato-desidrogenase  
GPX - glutaciona peroxidase  
GR - glutaciona redutase  
GSH - glutaciona reduzida  
GSSG - glutaciona oxidada  
Hb - hemoglobina  
IL-8 - isoleucina - 8  
L<sup>•</sup> - radicais lipídicos  
LO<sup>•</sup> - radical alcoxi lipídico  
LOO<sup>•</sup> - radicais peroxi  
LOOH - hidroperóxido lipídico  
MA - macrófagos alveolares  
NADPH - nicotinamida dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)  
NPN - neutrófilos polimorfonucleares

---

OTPD - oxigênio terapia prolongada domiciliar  
pO<sub>2</sub> - pressão parcial de oxigênio  
SatO<sub>2</sub> - saturação arterial de oxigênio  
SDS - dodecil sulfato de sódio  
SH - grupo sulfidríla livre  
SOD - superóxido dismutase  
TBA - ácido tiobarbitúrico  
TBARs- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TEP - tetraetoxipropano  
TNF $\alpha$  - fator de necrose tumoral  
XO - xantina oxidase

## Índice

RESUMO.....	8
SUMMARY.....	9
GRUPO DE TRABALHO.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).....	14
Oxidantes e Antioxidantes celulares.....	16
Conseqüências do ataque oxidativo.....	20
Conseqüências da hipóxia ou isquemia no metabolismo oxidativo.....	23
Outras fontes produtoras de radicais livres que contribuem para o desenvolvimento de DPOC.....	27
OBJETIVOS.....	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO I.....	76
ANEXO II.....	77
ANEXO III.....	78
ANEXO IV.....	79
ANEXO V.....	80

## Resumo

Portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) sofrem necessariamente adaptação à hipóxia, por apresentar saturação de oxigênio ( $\text{SatO}_2$ ) na hemoglobina mais baixa em relação a indivíduos normais. Aliado à doença, o hábito de fumar pode induzir aumento na produção de radicais livres, o que torna necessário adaptações bioquímicas nesses indivíduos.

Nesse estudo, avaliamos biomarcadores de estresse oxidativo e outros, que podem estar relacionados com a caracterização de alterações específicas induzidas pela doença e pelo tabagismo.

Participaram do estudo, voluntários do sexo masculino com idades entre 40 a 80 anos. O grupo foi dividido entre pacientes portadores de DPOC, fumantes e não fumantes. Os biomarcadores sanguíneos utilizados foram: atividades das enzimas catalase (CAT) e glutathione redutase (GR) para o sistema de defesa antioxidante, e da creatina quinase (CK) para lesão muscular, concentração de proteínas carboniladas (PC), de grupamentos sulfidril livres (SH), de ácido úrico (AU) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) para o ataque oxidativo, além das concentrações de hemoglobina e lactato.

Os resultados apresentados neste trabalho, sugerem que os parâmetros de saturação de oxigênio, lactato, concentração de hemoglobina, creatina quinase, catalase e grupamento sulfidril livres possam ser usados para caracterizar alterações específicas observadas nos três grupos.

## Summary

Patients suffering from Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) are likely to be adapted to hypoxic situation, as they present lower levels of oxygen saturated hemoglobin compared to normal individuals. This disease, as well as smoking habit potentially induce an increase on free radical generation what causes some biochemical adaptations.

In the present work we have analysed some biomarkers for oxidative stress as well as other biochemical parameters which could be used to characterize specific adaptations induced by COPD or smoking.

The study group comprized 40 to 80 years old male voluntiers, divided in COPD patients, smoking and non smoking individuals. The evaluated blood biomarkers were: the enzymatic activities of catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) for the antioxidant defense system and creatine kinase (CK) for muscle injury; the concentrations of carbonyl proteins (PC), total sulphydryl groups (SH), uric acid (AU) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) as indicators of oxidative attack, as well as hemoglobin and lactate concentrations.

---

Our results show that the parameters saturation of oxygen, lactate, hemoglobin, creatine kinase, catalase and total sulphydryl groups can be used to characterize specific alterations observed in the three distinct groups.

## Grupo de trabalho

---

Esse trabalho faz parte de um projeto conjunto entre o Laboratório de Bioenergética, do Departamento de Bioquímica, IB e a equipe da Profa. Dra. Ilma Paschoal, do Departamento de Pneumologia da Faculdade de Ciências Médicas que inclui o acompanhamento de vários parâmetros, desde psicológicos até metabólicos, envolvendo também outros Departamentos da FCM. Nossa participação nesse projeto prevê a caracterização das alterações induzidas pela adaptação à hipóxia em pacientes com DPOC, incluindo também o grupo controle, de indivíduos não fumantes e fumantes através de biomarcadores moleculares de estresse oxidativo. Após esta caracterização o grupo pretende, acompanhar esses mesmos biomarcadores ao longo do tratamento de oxigênio terapia e acompanhar algumas terapias antioxidantes sugeridas na literatura para avaliar quais seriam as mais eficazes na melhoria da qualidade de vida desses pacientes.

---

## INTRODUÇÃO

A respiração tem como objetivo o fornecimento de oxigênio ( $O_2$ ) aos tecidos e a remoção do dióxido de carbono ( $CO_2$ ) formado pelas reações do catabolismo celular. A respiração pode ser dividida em quatro grandes eventos funcionais:

1. Ventilação pulmonar ou renovação cíclica dos gases alveolares pelo ar atmosférico;
2. Difusão do  $O_2$  e do  $CO_2$  entre os alvéolos e o sangue;
3. Transporte no sangue e nos líquidos corporais, do  $O_2$  (dos pulmões para as células) e do  $CO_2$  (das células para os pulmões);
4. Regulação da ventilação.

Depois dos alvéolos terem sido ventilados com ar novo, a próxima etapa no processo da respiração é a *difusão* do  $O_2$  dos alvéolos para o sangue dos capilares alveolares e do  $CO_2$  em sentido oposto. O fenômeno da difusão decorre simplesmente da movimentação aleatória dessas moléculas, em ambos os sentidos, através da membrana respiratória.

O sangue é um tecido de transporte, perfazendo 5% do peso corporal total. É uma suspensão de vários tipos de células em um meio aquoso complexo, o plasma (Bloom & Fawcett, 1986). O plasma é a fase líquida do sangue, onde além das células sangüíneas estão dissolvidos vários componentes de extrema importância para o funcionamento do organismo como as proteínas albumina, transferrina, globulinas e eletrólitos como  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Cl^-$ , além da glicose, importante principalmente para o metabolismo do cérebro e das hemáceas. A

centrifugação de uma amostra de sangue permite separar do plasma seus constituintes celulares:

- Leucócitos
- Plaquetas
- Hemáceas

Os leucócitos são divididos de forma geral em neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos. Todos eles são responsáveis pelas complexas respostas imunológicas do organismo contra agentes externos, tais como vírus e bactérias (Bloom & Fawcett, 1986).

As plaquetas desempenham importante função no controle do sangramento e na gênese da trombose, isto é na formação de coágulo dentro dos vasos sangüíneos (Marcus & Zucker, 1965).

As hemáceas ou eritrócitos, são as células mais numerosas do sangue, ocupando cerca de 48% do seu volume total em homens adultos (Perutz, 1978). Embora seja uma célula anucleada e também desprovida de mitocôndrias, seu citoplasma possui todo o aparato enzimático necessário para a produção de energia necessária para assegurar a integridade da membrana celular, manter as concentrações iônicas (interna e externas), converter  $CO_2$  em íon bicarbonato (a principal via de transporte de  $CO_2$ ), além de prevenir a oxidação da hemoglobina em sua forma não funcional, a metahemoglobina (Bloom & Fawcett, 1986).

O principal componente proteico das hemáceas é a hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos. Assim, o  $O_2$  se liga reversivelmente à hemoglobina nos alvéolos pulmonares permitindo que numa saturação mais baixa de  $O_2$  este seja liberado para os tecidos (Antonini & Brunori, 1971). A curva de dissociação da hemoglobina de um indivíduo normal

apresenta uma forma sigmóide característica (Terzi, 1992). Vários são os fatores que influenciam no deslocamento desta curva, alterando a afinidade entre a hemoglobina e o oxigênio, o que permite sua liberação para os tecidos. Entre eles estão a própria pressão parcial de  $O_2$  ( $pO_2$ ) tecidual, pH e concentração de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG), seu principal modulador alostérico negativo (Benesch & Benesch, 1967; Harken, 1977).

O  $O_2$  absorvido pelo sangue que passa nos capilares alveolares está sendo continuamente trazido do meio externo para os alvéolos. Quanto mais rapidamente o oxigênio for absorvido, tanto menor é sua concentração nos alvéolos; por outro lado, quanto mais rapidamente o novo oxigênio é trazido da atmosfera para os alvéolos, tanto maior é a sua concentração. Portanto, nos alvéolos, a  $pO_2$  é controlada pela velocidade com que o novo oxigênio, graças ao processo da ventilação, entra nos pulmões e pela velocidade com que o oxigênio é absorvido pelo sangue (West, 1994).

Em algumas situações, a área de superfície de troca pode diminuir muito afetando assim a velocidade de difusão dos gases através da membrana. Por exemplo, a remoção de todo um pulmão diminui a área total à metade. Numa situação de enfisema, muitos alvéolos coalescem devido à dissolução de muitos septos alveolares. Desse modo, as novas câmaras são maiores do que os alvéolos originais e, em virtude da perda de septos alveolares, a área da membrana respiratória freqüentemente acha-se diminuída à quinta parte de sua extensão original. Quando a área total diminui para cerca de um terço a um quarto do normal, as trocas gasosas através da membrana sofrem diminuição significativa, mesmo em condições de repouso (Repine et alii, 1997). Durante competições esportivas e outros exercícios extenuantes, uma menor área de

membrana pulmonar pode constituir sério impecilho para as trocas gasosas (West, 1994).

Por sua vez, a maioria das pessoas que fumam há muito tempo desenvolve graus variados de obstrução crônica. Em fumantes, duas anormalidades concorrem para causar um desequilíbrio entre ventilação alveolar e fluxo sanguíneo pulmonar. Primeiro, como muitos dos pequenos bronquíolos se acham quase obstruídos, os alvéolos situados distalmente às obstruções recebem pouca ventilação. Segundo, nas áreas dos pulmões onde os septos alveolares foram destruídos mas ainda existe ventilação alveolar, a maior parte da ventilação é desperdiçada, pois o fluxo sanguíneo é desproporcionalmente pequeno em relação à ventilação (Fishman, 1992).

Na doença pulmonar obstrutiva crônica o colapso alveolar, conhecido como "shunt" pulmonar leva à uma grave alteração funcional do pulmão, diminuindo extraordinariamente sua eficácia como órgão trocador de gases, às vezes diminuindo essa eficiência a 1/10 do normal (West, 1992).

### **Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica ( DPOC)**

Entre as principais doenças que mais crescem no mundo em termos de mortalidade está a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Siafakas et alii, 1995). Embora as doenças específicas que compreendem a DPOC estejam definidas isoladamente, elas coexistem e podem ser de difícil reconhecimento. A DPOC geralmente inclui aquelas afecções que podem ser acompanhadas de obstrução crônica ou recorrente ao fluxo aéreo dentro dos pulmões. A localização da obstrução está nas pequenas vias aéreas, geralmente, em condutos aéreos com diâmetro menor que 2 mm (Fletcher & Pride, 1984).

Entre as afecções mais comuns estão a bronquite crônica, o enfisema pulmonar, a asma e as bronquiectasias. A consequência destas doenças é que as células dos portadores de DPOC vivem sob um regime de hipóxia, que causa danos teciduais e leva ao desenvolvimento de alterações bioquímicas, fisiológicas e neurocognitivas (Repine et alii, 1997).

O enfisema pulmonar é uma alteração anatômica do pulmão caracterizada pelo aumento anormal dos espaços aéreos distais dos bronquíolos terminais não respiratórios, acompanhada de alterações destrutivas das paredes alveolares (Matthay & Arroliga, 1996).

A bronquite obstrutiva crônica é uma alteração caracterizada por secreção excessiva de muco e tosse produtiva, na qual há um estreitamento persistente e difuso das vias aéreas pulmonares, determinando um aumento da resistência ao fluxo aéreo (Matthay & Arroliga, 1996).

As principais características da asma são excessiva irritabilidade e hiperreatividade das vias aéreas (brônquios contraídos) manifestadas por um estreitamento difuso das vias aéreas. Já a bronquiectasia é uma alteração anatômica caracterizada funcionalmente pela obstrução bronquiolar difusa e pela dilatação das vias aéreas proximais (Drazen, 1996).

Cerca de 2% dos casos de DPOC são de origem hereditária (deficiência da enzima alfa-1-antiprotease). Um outro exemplo é a fibrose cística, uma doença também hereditária transmitida como um traço autossômico recessivo, considerada como uma possível causa da bronquite crônica ou bronquiectasias em crianças e adultos jovens (Bone, 1996). Dez por cento dos casos de DPOC estão associados a diversos fatores como: poluição atmosférica, poluentes profissionais e infecções respiratórias, mas a principal causa da doença está associada ao hábito de fumar (STS Statement, 1995).

Indivíduos fumantes têm maior taxa de mortalidade por câncer pulmonar enfisema e bronquite crônica e apresentam testes de função pulmonar prejudicada quando comparado a não fumantes (U.S. Department of Health and Human Service, 1984). Não se sabe, entretanto, porque somente alguns fumantes desenvolvem DPOC. Acredita-se que este problema esteja relacionado a fatores genéticos intrínsecos e com a dieta individual (Repine et alii, 1997).

### **Oxidantes e Antioxidantes Celulares**

O  $O_2$  é uma das principais fontes de espécies reativas (radicalares ou não) pois no seu estado fundamental possui 2 elétrons desemparelhados de spins iguais, característica de um radical livre (Halliwell & Gutteridge, 1989). Assim, para que o  $O_2$  oxide outro átomo, este deve possuir também spins iguais. Este é o principal motivo pelo qual o  $O_2$  não reage prontamente com as biomoléculas pois em geral elas são espécies não radicalares, formadas basicamente por ligações covalentes e os elétrons que formam este tipo de ligação possuem spins opostos (Halliwell & Gutteridge, 1990). O caminho para a formação de espécies reativas de  $O_2$  (EROS) começa geralmente com a redução monoeletrônica do  $O_2$  com formação do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). A formação de  $O_2^{\cdot-}$  pode acontecer através de diferentes processos celulares. Estes, segundo Halliwell & Gutteridge (1989) e Blake et alii (1995) incluem:

- a) vazamento de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial,
- b) leucócitos ativados por microorganismos,

- c) atividade de várias oxidases solúveis (por exemplo a enzima xantina oxidase),
- d) autooxidação de várias moléculas pequenas (flavinas, catecolaminas, hidroquinonas)
- e) ativação microssomal de citocromos

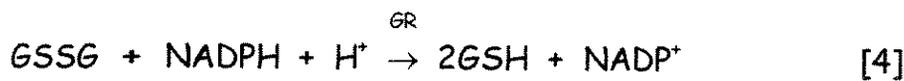
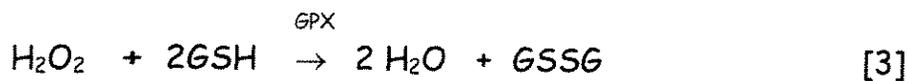
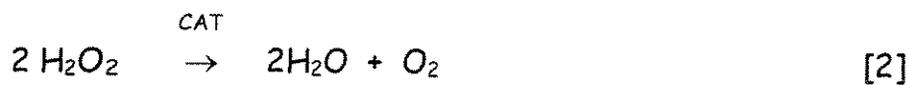
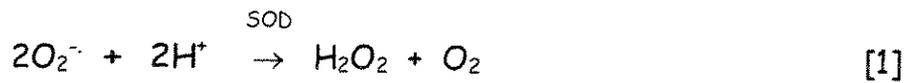
Dois desses radicais dismutam-se espontaneamente ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) formando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que não é uma espécie radicalar e como agente oxidante é considerado fraco (Halliwell & Gutteridge, 1989).



Entretanto, como o  $H_2O_2$  atravessa facilmente as membranas celulares, ao receber mais um elétron proveniente principalmente do  $Fe^{2+}$  ou do  $Cu^+$ , origina o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1992). Das espécies radicalares conhecidas esta é uma das mais reativas pois necessita de somente mais um elétron para se estabilizar. Recentemente, foi demonstrado também que a interação entre  $O_2^-$  e óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) gera peroxinitrito ( $ONO_2^-$ ), uma espécie não radicalar tão reativa quanto o  $OH\cdot$  (Ashi et alii, 1995). O  $NO\cdot$  por sua vez é formado a partir do aminoácido arginina, numa reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (Hevel & Marletta, 1994).

Os principais alvos das EROS são os fosfolipídeos de membranas celulares e subcelulares, DNA e proteínas. Como cerca de 10% das reações celulares que utilizam  $O_2$  geram EROS continuamente em nosso organismo a consequência biológica lógica é a existência de mecanismos de defesa antioxidantes, que podem ser enzimáticos ou não. Compõem o principal sistema de defesa antioxidante as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase

(CAT), as quais agem sobre  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , respectivamente (reações [1] e [2]), a glutathiona peroxidase (GPX), uma enzima dependente de selênio, a qual decompõe peróxidos usando o peptídeo glutathiona reduzido (GSH) como seu co-substrato (reação [3]) e a glutathiona redutase (GR) que catalisa a redução, às custas de NADPH, do GSSG formado na reação anterior (reação [4]) (Sies, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1989). O funcionamento do sistema glutathiona peroxidase/glutathiona redutase permite a eliminação de outros peróxidos orgânicos além do  $H_2O_2$ .



Os antioxidantes não enzimáticos incluem o ascorbato, carotenóides, flavonóides, vitamina E, entre outros (Sies, 1986). Alguns autores consideram o ácido úrico um potente sequestrador de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), radicais peroxil ( $RO_2^{\cdot}$ ) e  $OH^{\cdot}$  (Ames et alii, 1981). O ácido úrico também pode inibir a peroxidação lipídica ligando-se a íons de ferro e cobre de forma a não estimular reações radiculares (Halliwell & Gutteridge, 1989). Existe uma proposta de que o ácido úrico funcione como um antioxidante *in vivo*, suportada pelo fato de a alantoína, um produto da oxidação do ácido úrico, estar acumulada em algumas condições de estresse oxidativo (Ames et alii, 1981).

Além disso, ferritina e transferrina, também possuem importante papel na proteção das células pelo armazenamento de íons de ferro na forma férrica, que não podem catalisar a formação de radicais livres, a menos que sejam liberados na forma de íon ferroso por agentes redutores (Halliwell & Gutteridge, 1989; Blake et alii, 1995)

O fato de os radicais livres serem produzidos normalmente em condições fisiológicas levou à proposição de que EROS também poderiam exercer funções de segundo mensageiro celular (Suzuki et alii, 1997). A proposta é que em baixas concentrações, da ordem de  $10^{-8}$  ou  $10^{-9}$  M, as EROS modulariam o estado redox de proteínas transdutoras de sinal, através da interação com receptores (Gutteridge, 1993). Recentemente, espécies oxidantes como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  e hidroperóxidos lipídicos (intermediários da cadeia de peroxidação lipídica) foram correlacionados com a indução de vários processos biológicos como crescimento celular, adesão das células, apoptose celular e ativação do vírus HIV (Iuliano et alii, 1994).

Por sua vez, a descoberta da enzima responsável pela decomposição de  $O_2^{\cdot-}$  deu início aos estudos sobre o metabolismo do oxigênio (McCord et al, 1969). A existência da SOD sugeria que o  $O_2$ , além de vital poderia também ser tóxico para os organismos vivos e que várias doenças poderiam ter sua etiologia baseada no aumento na formação de EROS. Desde a década de 80 as EROS têm sido relacionadas, direta ou indiretamente a várias doenças, tais como aterosclerose, câncer, danos causados por reperfusão, etc (Blake et alii, 1995; Gutteridge, 1993; Knight, 1995). As EROS também parecem possuir grande importância no dano celular induzido por processos inflamatórios crônicos e várias doenças do sistema nervoso central (Gutteridge, 1993). Entretanto, atualmente é praticamente consenso que a instalação de um estresse oxidativo

para as células seria a condição desencadeante da ação tóxica das EROS nessas doenças. Ou seja, parece ser importante o estabelecimento de um desequilíbrio entre ataque oxidativo e defesa antioxidante para aumentar o dano celular (Halliwell & Gutteridge, 1989; Hermes-Lima et alii, 1998). Assim, pode-se definir estresse oxidativo como aumento da exposição a agentes oxidantes e/ou diminuição na capacidade de defesa antioxidante do organismo (Heffner & Repine, 1989; Sies, 1991). Acredita-se que no caso da DPOC o estresse oxidativo possa ser gerado pelo excesso de oxidantes produzidos pelo fumo, pelas células fagocitárias presentes durante a inflamação e pelo processo de isquemia/reperfusão, ao qual estes pacientes estão sendo constantemente submetidos (Repine et alii, 1997).

## **Consequências do Ataque Oxidativo**

### **Peroxidação Lipídica**

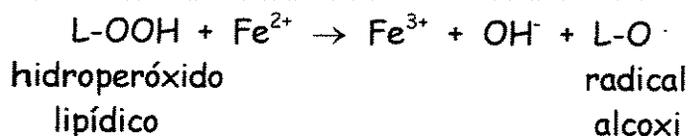
As membranas celulares e intracelulares, especialmente a membrana interna da mitocôndria, por possuírem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, são um alvo importante ao ataque dos radicais livres. As reações iniciadas por radicais livres tendem a ocorrer em cascata. As ligações C—H da cadeia dos ácidos graxos poliinsaturados são enfraquecidas pela dupla ligação adjacente tornando, desta forma, os H suscetíveis a serem abstraídos por radicais livres.

Espécies com alto potencial reativo, como por exemplo o radical hidroxila, podem abstrair tal hidrogênio deixando o carbono do fosfolípido com um elétron desemparelhado. Esse radicais lipídicos (L·) se rearranjam

molecularmente em dienos conjugados. Os dienos conjugados reagem com  $O_2$  formando radicais peroxi ( $LOO\cdot$ ). Estes radicais peroxi são oxidantes potentes e conseguem abstrair um segundo átomo de hidrogênio de um outro ácido graxo, propagando assim a cadeia. Forma-se então um hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ).

Desta maneira, o radical iniciador começou um processo autocatalítico que converte a maioria dos ácidos graxos dos fosfolipídios de membrana em hidroperóxidos (Halliwell & Guteridge, 1989). Este processo é conhecido como peroxidação lipídica e pode exercer três efeitos biológicos: diminuir a fluidez das membranas, inativar enzimas a elas ligadas e alterar o metabolismo, através do aumento da permeabilidade a íons e pequenas moléculas, chegando eventualmente a causar a perda completa da integridade da biomembrana (Nepomuceno et alii, 1997; Nepomuceno et alii, 1999).

O processo de peroxidação lipídica prossegue, porque os hidroperóxidos lipídicos, na presença de  $Fe^{2+}$ , podem ser oxidados a radicais alcoxi lipídicos ( $LO\cdot$ ), que sofrem quebra na ligação  $C-C$  seguinte e dão origem a aldeídos de baixo peso molecular, principalmente malonaldeído e  $\beta$ -hidroxinonanal e hidrocarbonetos com etano e n-pentano (Halliwell & Guteridge, 1989).



Os aldeídos de baixo peso molecular reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando complexos coloridos e podem ser quantificados (Halliwell & Guteridge, 1989). Estes complexos, formados por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), podem ser usados como indicadores da

ocorrência da peroxidação lipídica nos sistemas biológicos podendo ser medidos por espectrofotometria ou por fluorescência (Yagi,1976).

Alguns estudos mostram que a concentração de TBARs está aumentada no plasma de pacientes com DPOC tanto na fase aguda quanto na crônica (Wielders et alii, 1997). Produtos de peroxidação lipídica encontraram-se em concentrações aumentadas no plasma e em lavado broncoalveolar de fumantes, pacientes com enfisema, bronquite crônica e asma (Bridges et alii, 1993). Além disso a exposição ao cigarro foi relacionada a um aumento na peroxidação lipídica em plasma *in vitro* (Cross et alii,1993).

Dados importantes nesta área se baseiam em medir os níveis de isoprostanos-F2 livres e esterificados (compostos bioativos como prostaglandina F2 que são formados pela peroxidação do ácido araquidônico) que estavam aumentados em fumantes quando comparados a não fumantes. Os níveis destes compostos diminuíram quando alguns indivíduos deixaram de fumar por 2 semanas. Em alguns indivíduos fumantes estes compostos estavam dentro dos valores normais ou levemente aumentados. Estes dados são consistentes com a possibilidade de certos indivíduos serem mais resistentes ao estresse oxidativo, talvez como consequência do aumento de suas defesas antioxidantes (Morrow et alii,1995).

### **Oxidação de proteínas**

Um importante alvo para a ação dos radicais são as proteínas, embora até recentemente tais reações tenham recebido pouca importância na literatura, se comparadas com os ataques radicalares a lipídios e DNA. Trabalhos feitos por Garrison (1987) mostraram que muitos produtos de oxidação podem ser gerados como resultado do ataque de radicais a proteínas.

Como os aminoácidos que compõem as proteínas são suscetíveis a reações com EROs sua modificação oxidativa rompe a estrutura secundária e terciária de proteínas, aumentando a hidrofobicidade destas por exposição dos aminoácidos hidrofóbicos do seu interior. O radical hidroxila é particularmente proteotóxico pois pode reagir com o carbono alfa de qualquer aminoácido. Por sua vez, além de potencialmente danificar a função das proteínas, a sua oxidação também marca as proteínas a serem degradadas em peptídeos e eventualmente em aminoácidos (Ryter et alii, 1990). Assim, uma variedade de produtos pode ser obtida depois do ataque oxidativo a proteínas, tais como: hidroxilação de aminoácidos aromáticos onde o OH<sup>•</sup> ataca o anel aromático do aminoácido; oxidação de aminoácidos que possuem enxofre (cisteína); peroxidação de aminoácidos alifáticos; formação de grupos carbonila; processos que estão associados à perda ou alteração das funções da proteína (Garrison, 1987; Dean et alii, 1997). Entretanto, a despeito da importância do assunto poucos trabalhos na literatura utilizam como biomarcadores de estresse oxidativo produtos de proteínas modificadas.

### **Conseqüências da hipóxia ou isquemia no metabolismo oxidativo**

A hipóxia celular pode ser definida como uma limitação na quantidade de O<sub>2</sub> disponível para síntese de ATP mitocondrial e pode ser desencadeada por diminuição na perfusão capilar (isquemia), diminuição na pO<sub>2</sub> arterial (hipoxemia) ou diminuição da concentração de hemoglobina (anemia). A hipóxia crônica leva também à vasoconstrição da rede arterial pulmonar, e conseqüentemente ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar e insuficiência

cardíaca congestiva direita, conhecida também como "cor pulmonale" (Hogdkin & Petty, 1987).

Diminuições na disponibilidade de  $O_2$  desencadeiam uma série de mecanismos adaptativos destinados a manter a atividade celular num nível mínimo aceitável para a sobrevivência. O fracasso destes mecanismos pode levar à disfunção celular e acarretar danos irreparáveis (Epstein, 1985). Entretanto, a resposta celular à hipóxia é heterogênea: células musculares retornam à função normal após 30 minutos de isquemia total e hepatócitos não apresentam danos irreversíveis mesmo após 150 minutos de isquemia. Já as células cerebrais aparentemente não suportam mais do que 6 minutos de hipóxia sem lesão irreparável (Epstein, 1985).

#### **Alterações decorrentes da queda dos níveis de $O_2$ :**

##### Aumento da concentração de $Ca^{2+}$ intracelular:

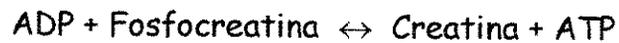
O íon  $Ca^{2+}$  tem um papel extremamente importante de 2º mensageiro no metabolismo e na fisiologia celular, tal como na atividade da glicogenólise, gliconeogênese, divisão celular, contração muscular, etc (Cobbold & Rink, 1987; Le Masters et alii, 1987; Gunter et alii, 1994)

Em condições de hipóxia ocorrem alterações no transporte de  $Ca^{2+}$  através da membrana celular, com conseqüente aumento de sua concentração no citosol. Este aumento, se mantido por um longo período de tempo pode interromper as funções mitocondriais e induzir a formação de numerosas evaginações na membrana das células. Isto ativa enzimas catabólicas dependentes de  $Ca^{2+}$ , tais como fosfolipases, endonucleases e proteases, podendo levar à morte celular (Carafoli, 1987). Daí a grande importância para as células em manter a homeostase deste íon nos compartimentos intra e extracelulares.

Aumento na utilização de processos anaeróbicos de produção de energia:

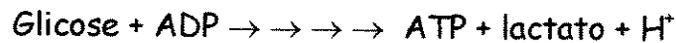
A maior parte do ATP necessário para as funções celulares é produzido nas mitocôndrias, pelo processo aeróbio, através da fosforilação oxidativa. Na ausência ou em baixa concentração de  $O_2$  a produção mitocondrial de ATP é diminuída, sinalizando a ativação dos processos anaeróbios a fim de manter os níveis necessários de ATP. Os processos anaeróbicos podem ser:

a) Sistema ATP- fosfocreatina: onde a síntese de ATP vem da reação catalisada pela enzima creatina quinase, mostrada a seguir:

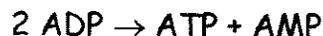


b) Glicólise anaeróbica: onde a produção de ATP vem da quebra parcial da glicose ou do glicogênio com conseqüente aumento da concentração de lactato:

via glicolítica



c) Reação da adenilato quinase: onde a produção de ATP decorre da utilização de duas moléculas de ADP:



Esta reação leva ao acúmulo de AMP, pois é uma reação irreversível. Este AMP pode ser parcialmente desfosforilado a adenosina pela 5'-nucleotidase. A adenosina formada nas células cai na circulação, onde age como potente vasodilatador em muitas redes vasculares, exceto na vasculatura renal onde produz vasoconstrição (Berne, 1986).

O metabolismo do AMP leva também à produção de ácido úrico conforme mostrado na Figura 1, sendo que as últimas reações (hipoxantina  $\rightarrow$  xantina  $\rightarrow$  ácido úrico) são controladas pela mesma enzima, xantina desidrogenase, tendo também NADH como produto final. Num processo de isquemia ocorre acúmulo

de seus substratos (xantina e hipoxantina). Além disso, o aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ativar uma proteinase responsável por converter a enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase, que passa a utilizar  $\text{O}_2$  como aceptor de elétrons, com consequente produção de  $\text{O}_2^-$  (Epstein, 1985).

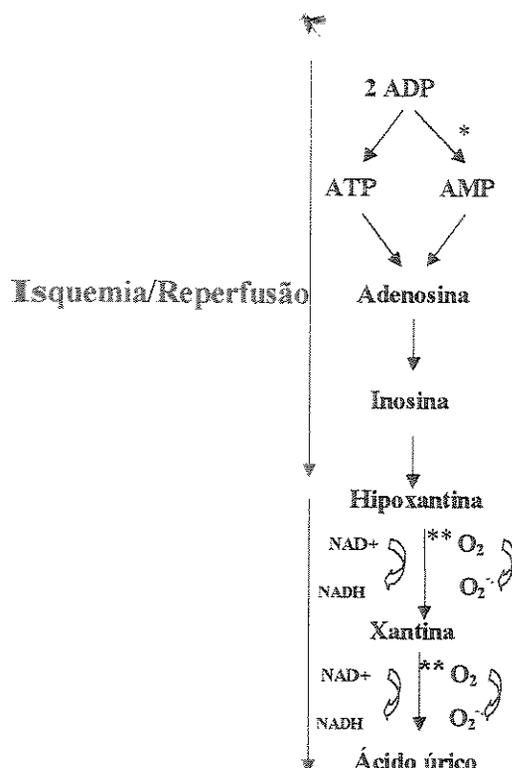


Figura 1. Mecanismo proposto para a produção de radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) pelo processo de isquemia/ reperfusão. Adenilato quinase (\*) e Xantina oxidase (\*\*).

A XO está associada a danos teciduais induzidos por isquemia em intestino (Granger et alii, 1981), coração (Chambers et alii, 1985), pulmão (Archer et alii, 1989), cérebro (Chan et alii, 1984) e músculo esquelético (Lindsay et alii, 1988). Acredita-se também que o maior dano celular devido a atividade da xantina oxidase seja causado no processo pós-isquemia, ou seja, na

reperfusão. A produção de EROS durante a reperfusão tem sido atribuída a duas fontes: ao vazamento de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial devido ao acúmulo de NADH durante a isquemia e à atividade aumentada da enzima xantina oxidase (Ruuge et alii, 1991).

A maioria dos pacientes portadores de DPOC, apresentam pressão arterial de  $O_2$  muito baixa, ou seja, menor ou igual a 55 mmHg em repouso. Devido a estas condições, o tratamento mundialmente utilizado é a oxigenoterapia prolongada domiciliar (OTPD) (Stuart-Harris et alii, 1981). Com a OTPD estes pacientes estarão constantemente sujeitos à reperfusão, o quê, conseqüentemente, poderá levar a alterações celulares ainda mais intensas.

### **Outras Fontes Produtoras de Radicais Livres que Contribuem para o Desenvolvimento de DPOC**

De acordo com dados do Surgeon General's Report de 1989, em 1985 o fumo contribuiu com 87% das mortes por câncer pulmonar, 82% das mortes por DPOC e 21% das mortes por doenças cardiovasculares (US Department of Health and Human Services, 1989). Além disso, alguns autores estimaram que entre os anos 1995 e 2000 haverá 2,1 milhões de mortes como consequência do fumo entre homens e mulheres no mundo (Peto et alii, 1992).

A composição do tabaco do cigarro é muito complexa, possuindo mais de 4000 constituintes hoje já identificados. Pryor e colaboradores identificaram duas populações de produtores de radicais livres diferentes no cigarro, uma no alcatrão e outra na fase gasosa (Pryor et alii, 1983; Church et al, 1985). O principal radical no alcatrão é o complexo quinona/hidroquinona

capaz de reduzir o  $O_2$  a  $O_2^-$ . A fase gasosa contém pequenos radicais centrados no carbono e oxigênio que são mais reativos que os radicais do alcatrão. Além disso, o fumo contém uma variedade de outros agentes que são teratogênicos ou carcinogênicos e que são capazes de reagir ou inativar constituintes celulares essenciais. A transformação de células normais em células malignas envolve uma série de mudanças nas quais estão incluídas indução e ativação de sistemas enzimáticos (Church et al, 1985).

Os oxidantes presentes no cigarro não só podem levar ao dano em DNA, proteínas e lipídios, como também parecem ser responsáveis pela alimentação de vários processos que poderiam levar ao desenvolvimento de DPOC. Por exemplo, os oxidantes aumentam a produção de glicoconjugados epiteliais de alto peso molecular (muco) em cultura de células (Adler et alii, 1990) e prejudicam a função ciliar (Feldman et alii, 1994). Oxidantes também estimulam a formação de tromboxana, reduzem a atividade surfactante, provocam danos nos fibroblastos, promovem aumento na permeabilidade epitelial e produzem numerosos outros efeitos que poderiam diminuir os mecanismos de reparo em pacientes com DPOC (Jones et alii, 1980).

A etiologia da DPOC ainda não foi totalmente caracterizada, mas acredita-se que sua principal causa seja a inativação de antiproteases por oxidantes existentes na fumaça do cigarro como o NO e os produzidos por células fagocitárias como o  $O_2^-$ . A produção destes oxidantes tem primariamente um significado defensivo, pois permite a estas células realizar uma rápida lise das bactérias fagocitadas. Porém, sua produção excessiva inibe antiproteases aumentando a atividade da enzima elastase, responsável por degradar elastina e uma variedade de proteínas da membrana plasmática como proteoglicanos e glicoproteínas, danificando os espaços aéreos pulmonares

(Janoff, 1983). Estudos feitos em macrófagos alveolares (MA) obtidos de lavados broncoalveolares de fumantes mostraram maior atividade de elastase que em não fumantes. Este aumento poderia estar relacionado com o aparecimento de obstruções aéreas (Rodríguez et alii, 1977; Jordan et alii, 1993).

Outro fator apontado como um importante contribuidor para o desenvolvimento de DPOC é a **disponibilidade de íons ferro**. Devido a sua alta reatividade, o ferro geralmente se encontra ligado a proteínas como transferrina, ceruloplasmina e ferritina. Os oxidantes presentes no cigarro podem liberar o ferro da ferritina como parece acontecer nos portadores de DPOC (Lapenna et alii, 1995). Encontrou-se uma concentração de ferro aumentada em MA de fumantes quando comparada aos de não fumantes. Além disso, verificou-se que os fluidos pulmonares obtidos de fumantes continham mais ferro que os de não fumantes (Thompson et alii, 1991). A fonte de ferro em pulmões de fumantes é desconhecida, mas cada cigarro contém 0,042 µg de ferro. Além disso, este elemento também tende a se acumular com o aumento da idade no homens e pós-menopausa nas mulheres (Cook et alii, 1976).

O **processo inflamatório** também contribui para o desenvolvimento de DPOC causando a limitação do fluxo aéreo pelo estreitamento do lúmen aéreo e constrição bronquiolar, fibrose e aumento do tônus da musculatura lisa. Os oxidantes produzidos pelas células fagocitárias, como o  $O_2^-$  e íon hipocloroso ( $OCl^-$ ) são formados principalmente pelos neutrófilos polimorfonucleares (NPM) e MA, presentes em grande quantidade nas vias respiratórias baixas dos fumantes. O cigarro aumenta abundantemente o número de neutrófilos do pulmão (Pryor et alii, 1986). Outros trabalhos mostram que o número de eosinófilos está aumentado tanto em biópsia quanto em lavado broncoalveolar

de bronquíticos crônicos, sendo estas células as principais responsáveis pelo aumento de  $O_2^-$  nestes pacientes (Saetta et alii, 1993; Lebowitz & Postma, 1995).

Em fumantes, o histórico cumulativo do cigarro está altamente correlacionado a uma leucocitose, refletindo um processo inflamatório que ocasionaria um acúmulo de MA e de NPM nos pulmões (Hunninghake & Crystal, 1984). Adicionalmente, há um aumento no metabolismo oxidativo dos MA e NPM. O aumento no metabolismo oxidativo de células fagocitárias é acompanhado pelo aumento na geração de EROS.

Estudos já mostraram que a produção de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  por macrófagos estava aumentada em fumantes (Dekhuijzen et alii, 1996). Além disso, fumantes comparados a não fumantes possuem maior atividade de uma enzima produzida por neutrófilos ativados, a mieloperoxidase (enzima que apresenta atividade peroxidásica não específica) levando a formação de  $OCl^-$ . Com a ativação da mieloperoxidase ocorre liberação de collagenases, gelatinases, elastases, lisozimas e várias outras enzimas hidrolíticas responsáveis pelo dano alveolar (Bridges et alii, 1985).

Um dos principais alvos de ataque do  $OCl^-$  é a enzima alfa-1-antiprotease, a maior inibidora das soro proteases circulantes. A alfa-1-antiprotease é rapidamente inativada por  $OCl^-$ , perdendo sua capacidade em inibir a elastase. O  $OCl^-$  pode também interagir com  $H_2O_2$  formando oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), espécie também altamente reativa. Assim, o processo de ativação das células fagocitárias pode estar associado a um incremento do metabolismo oxidativo celular, "respiratory burst" ou explosão respiratória com conseqüente formação de compostos oxidantes. Entre as principais células responsáveis pelo aumento de  $O_2^-$  em bronquíticos crônicos estão os

eosinófilos (Saetta et alii, 1993). Um estudo feito por Zoratti e colaboradores (1991) mostrou que *in vitro* os eosinófilos produzem muito mais  $O_2^-$  que NPM e MA. A reversibilidade da obstrução aérea correlacionada com a obstrução bronquial em pacientes com DPOC, sugeriu que estas células contribuem para o estresse oxidativo pulmonar. Um esquema explicativo das várias etapas envolvidas na instalação da DPOC em fumantes está apresentado na Figura 2.

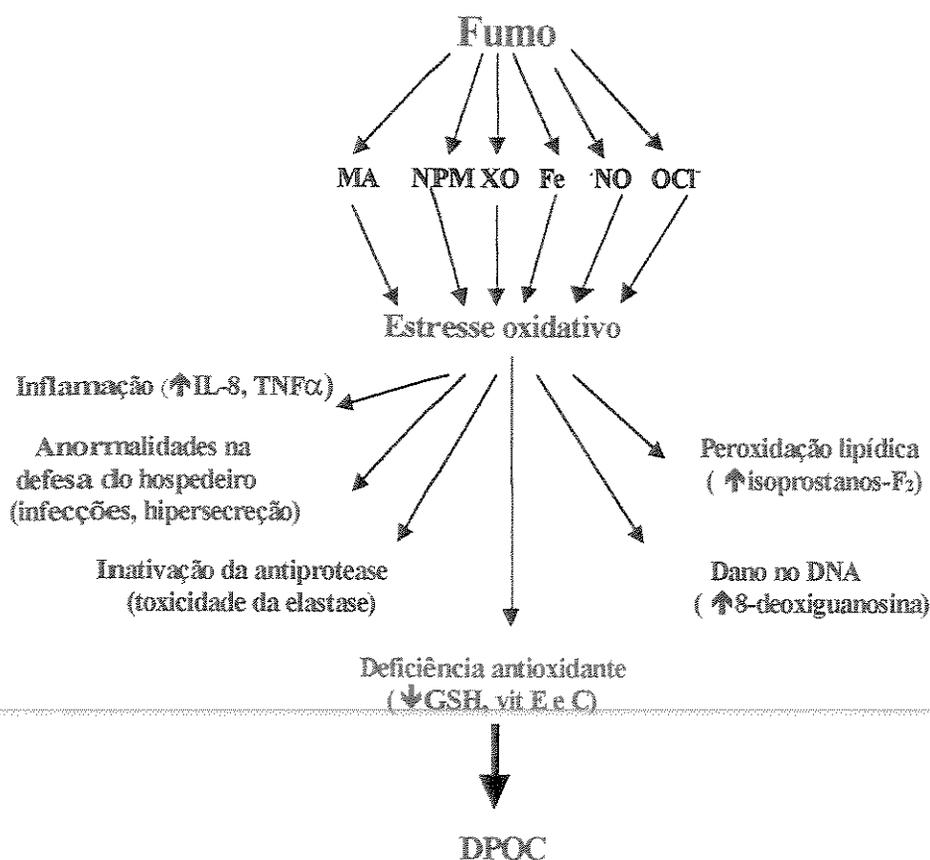


Figura 2. Fumo, estresse oxidativo e DPOC. Numerosos processos aumentam o estresse oxidativo pulmonar e contribuem para o desenvolvimento de DPOC. Macrófagos (MA), neutrófilos polimorfonucleares (NPM), xantina oxidase (XO), óxido nítrico (NO), íon hipocloroso (OCI), isoleucina-8 (IL-8) e fator de adesão de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ). Adaptado de Repine et alii, 1997.

Por sua vez, o muco que reveste o trato respiratório contém uma variedade de antioxidantes com a função de proteger as células do trato respiratório contra o dano tecidual (Eiserich et alii, 1995).

Um estudo mostrou que em eritrócitos de alguns fumantes a atividade das enzimas glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD) e GPX era menor quando comparada à atividade destas mesmas enzimas em não fumantes. Nestes sujeitos os eritrócitos foram mais susceptíveis à peroxidação lipídica 'in vitro' quando comparados a eritrócitos de não fumantes e este efeito foi revertido pela presença de vitamina E (Duthie et alii, 1991).

O fumo tem sido associado à diminuição plasmática de ascorbato,  $\beta$ -caroteno e vitamina C (Murata et alii, 1989). Fluidos alveolares de fumantes contém menor concentração de vitamina E e uma dieta com suplementação desta vitamina diminuiu os níveis de peroxidação lipídica no plasma (Brown et alii, 1994). Ao contrário da vitamina E, alguns fumantes possuem concentrações alveolares de vitamina C maiores que em não fumantes o que pode ser interpretado como uma resposta ao alto estresse oxidativo nos pulmões de fumantes (Bui et alii, 1992).

Contrariamente, outros estudos mostraram que alguns fumantes apresentavam um aumento dos antioxidantes no plasma quando comparado ao de pessoas não fumantes, diminuindo assim os níveis de peroxidação lipídica (Mezzetti et alii, 1995). Este aumento nos antioxidantes pode ocorrer em indivíduos que desenvolvem uma tolerância a presença de oxidantes, como último recurso para resistir ao estresse oxidativo, devido a suas composições genéticas ou outras razões desconhecidas (McCusker & Hoidal, 1990). O que poderia explicar porque alguns fumantes não desenvolvem DPOC. Entretanto, a obtenção de uma relação mais direta entre níveis de antioxidantes e fumo

ainda não está totalmente caracterizada devido às inúmeras variáveis que podem interferir com este sistema, como estilo de vida, dieta e classe social dos indivíduos.

---

## Objetivos

No presente estudo foram avaliados alguns biomarcadores metabólicos em amostras de sangue de indivíduos não fumantes, fumantes e pacientes com insuficiência respiratória crônica antes do início do tratamento de oxigenioterapia com a finalidade de comparar e verificar se ocorriam adaptações bioquímicas específicas induzidas pela doença e pelo tabagismo.

Um dos objetivos foi determinar os valores de referência destes biomarcadores para a população da cidade de Campinas e Região a fim de comparar com os valores já citados na literatura, determinados principalmente em outros Países. Acreditamos que esta caracterização poderá proporcionar para o grupo portador de insuficiência respiratória crônica com indicação de oxigenioterapia uma forma mais precisa de acompanhamento ao longo do tratamento podendo ser útil também para verificar a eficácia de diferentes terapias antioxidantes.

Outro objetivo do presente trabalho foi caracterizar as adaptações nos biomarcadores utilizados induzidos pelo hábito de fumar e em pacientes com DPOC.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Escolha dos voluntários

Este estudo foi realizado em voluntários do sexo masculino com idade entre 40 a 80 anos. Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética Médica (anexo I) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (anexo II) do HC da Unicamp. Foi obtida também a aquiescência individual de cada voluntário selecionado. Os termos de consentimento estão apresentados nos anexos III e IV.

A seleção dos pacientes e da população controle foi feita em função da saturação arterial de  $O_2$  no sangue ( $SatO_2$ ) medida através de oxímetro de pulso do tipo **Pulsox<sup>TM</sup> 3** - Minolta. O oxímetro é um instrumento fotométrico que realiza medidas não invasivas da  $SatO_2$  e da pulsação do indivíduo.

Foram excluídos voluntários que praticavam exercícios físicos.

A relação entre a  $SatO_2$  na hemoglobina e a pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ , mmHg) é mostrada na figura 3, apresentada a seguir:

---

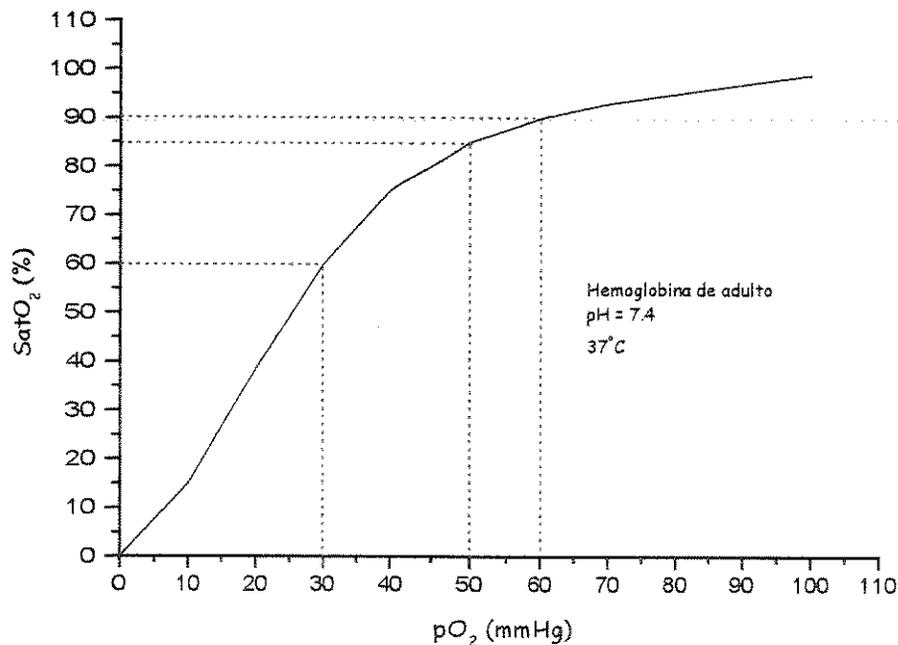


Figura 3. Relação da saturação arterial de oxigênio e a pressão parcial de oxigênio no sangue. Adaptado de Oxygen Saturation Monitor Pulsox™- 3 - Instruction manual.

Os voluntários foram divididos em :

- a) grupo não fumante: constituído de voluntários não fumantes.
- b) grupo fumante: constituído de voluntários que fumavam a mais de 10 anos e fumando em média 20 cigarros por dia.

Ambos os grupos foram formados por indivíduos saudáveis, na sua maioria doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas que não estavam tomando medicamentos, não apresentavam história de problemas pulmonares e com %Sat O<sub>2</sub> ≥ 96%. Foram excluídos voluntários que praticavam exercícios regularmente.

- c) grupo de pacientes: foram incluídos todos os pacientes admitidos no serviço de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Unicamp que

apresentassem um quadro clínico e gasométrico que indicasse a oxigênio-terapia domiciliar.

Os critérios para indicação de oxigenioterapia domiciliar já estão bem estabelecidos na prática médica por Cooper et alii (1987) e podem ser assim sumarizados em:

- $pO_2 \leq 55$  mmHg ou  $Sat O_2 \leq 88$  %;
- $pO_2$  entre 56 a 59 mmHg ou  $Sat O_2 = 89$ % com:
  - Evidência clínica e/ou laboratorial de cor pulmonale;
  - Hematócrito > 56%.

## **2. Preparo das amostras de sangue. Obtenção das soluções de hemoglobina (hemolisado total)**

Coletou-se 5 mL de sangue da veia antecubital em tubos contendo heparina e centrifugou-se a 3000x g por 10 minutos. O sobrenadante (plasma) foi separado e armazenado a - 80 °C após ser tratado com butilhidroxitolueno (BHT) 90  $\mu$ M, um conhecido sequestrador inespecífico de EROS, para posteriores análises da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), grupamento sulfidrila total e proteínas carboniladas.

As hemáceas foram lavadas com solução gelada de tampão fosfato 0.1M com NaCl 0.9% pH 7.4 e centrifugadas a 700 x g por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Repetiu-se o procedimento por 3 vezes. Foram retiradas alíquotas de 500  $\mu$ L que foram hemolisadas com H<sub>2</sub>O na proporção 1:1 (v/v) e armazenadas a -80 °C para as análises da atividade das enzimas GR e CAT.

### 3. Biomarcadores de ataque de radicais livres

A ocorrência de ataque a proteínas e lipídios por radicais livres foi analisada através de três metodologias: dosagem da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), quantificação do acúmulo de proteínas carboniladas e dosagem da concentração de grupamentos sulfidríla totais no plasma.

#### a) Determinação da concentração de hemoglobina

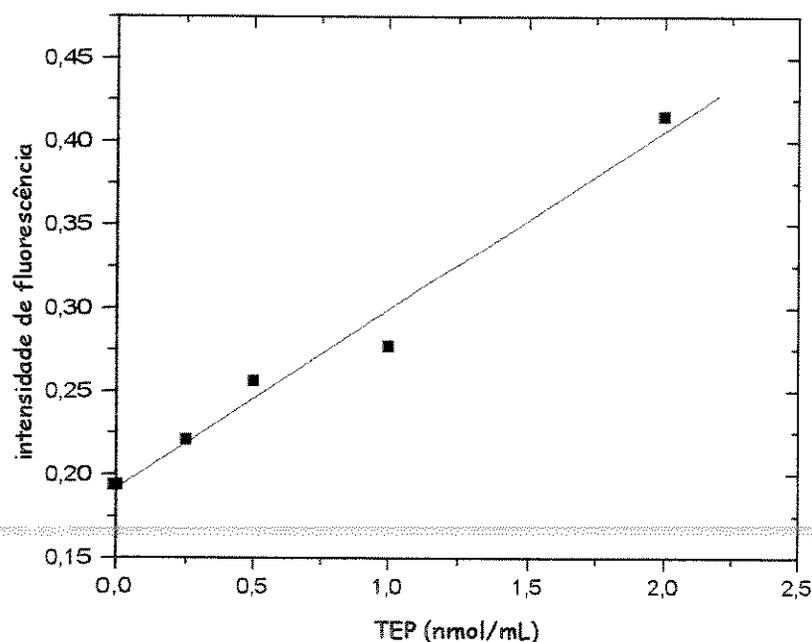
Foi realizada através do método de Drabkin (Beutler, 1975) onde a Hb em presença de reagente de Drabkin (Beutler, 1975) forma um composto, a cianometahemoglobina, que absorve em 540 nm e cujo coeficiente de extinção milimolar é  $11,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### b) Análise de peroxidação lipídica "in vivo"

- Dosagem de TBARS: Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído e outros aldeídos de baixo peso molecular) que ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) formam base de Schiff. Esses complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada por espectrofotometria a 535 nm ou fluorescência a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão (Yagi, 1976).

O método que permitiu a quantificação de TBARS no plasma dentro de um faixa segura de sensibilidade foi o proposto recentemente por Lotito & Fraga, 1998. Neste método, 100  $\mu\text{L}$  do plasma descongelado foi tratado com mais 50  $\mu\text{L}$  de BHT 4% (w/v em etanol), 500  $\mu\text{L}$  de SDS 0,3% (w/v), 2 mL de

HCl 0,1 M e 300  $\mu$ l de ácido fosfotungístico 10% (w/v). Após agitação vigorosa adicionou-se 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,7% (w/v) incubando-se a mostra em banho-maria a 90°C por 45 minutos. Após rápido resfriamento das amostras em banho de gelo, o complexo formado com o ácido 2-tiubarbitúrico (TBARs) foi extraído com 3 mL de n-butanol. A leitura da fase orgânica foi feita em espectrofluorímetro a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão. A concentração de TBARs foi calculada e expresso em nmolTBARs/mL de plasma usando-se a curva padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) mostrada na figura 4.



**Figura 4:** Curva padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP)

### c) Quantificação de proteínas carboniladas em plasma

Este método foi o proposto por Levine et alii (1990). O composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) se complexa com grupamentos carbonilados das proteínas, formando bases de Schiff que absorvem a 380 nm.

A amostra de plasma (100 $\mu$ L) foi diluída com 900  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O deionizada tratada com ácido tricloroacético 20% para precipitação das proteínas, centrifugada a 3000 x g por 10 minutos na temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Os experimentos foram feitos em triplicata sendo 3 tubos para amostra, onde foi adicionado 1 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,01M em HCl 2M e 3 tubos para o branco onde adicionamos 1 mL HCl 2M. Em seguida incubamos a solução por 60 minutos a 37°C com agitação a cada 15 minutos. Após a adição de 1mL de ácido tricloroacético 20% as alíquotas foram centrifugadas a 3000 x g por 15 minutos na temperatura ambiente e o sobrenadante foi novamente descartado. Lavou-se o precipitado com 1 mL de solução etanol/acetato de etila (1:1) para remover o reagente em excesso. Após 10 minutos descartou-se o sobrenadante. Essas lavagens foram repetidas até se obter um sobrenadante claro que foi descartado. A seguir dissolveu-se o precipitado em 1 mL de solução de guanidina 6M preparada em tampão fosfato de potássio 20 mM cujo pH 2,3 foi ajustado com ácido tricloroacético. A solução de guanidina foi usada com o branco e determinou-se a absorvância da amostra a 380 nm, calculando a concentração das bases de Schiff usando-se o coeficiente de absorção de 22000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. O resultado foi dado em  $\mu$ mol/mL (Levine et alii, 1990).

d) **Quantificação de grupamentos Sulfidrila livres em plasma.**

Os grupos sulfidrila são encontrados sempre em baixas concentrações em pessoas com doenças, tais como doenças cardiovasculares e artrites reumatóides (Hall & Gillan, 1979).

O método proposto por Hu (1994) é baseado na redução do 5,5-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB).

Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do plasma foi misturada com 1mL de tampão Tris-EDTA pH 8,2 e lida a absorvância em 412 nm com auxílio de um espectrofotômetro (medida  $A_1$ ). Após isto foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de DTNB 10 mM diluído em metanol. Esperou-se 15 minutos à temperatura ambiente e fez-se a leitura novamente ( $A_2$ ) junto com um branco contendo somente DTNB e tampão Tris-EDTA (Hu, 1994). Os grupamentos sulfidrilas livres foram calculados usando o coeficiente de absorvidade molar de  $13600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  da seguinte forma:

$$(A_2 - A_1 - B) \times (a/b)/13600$$

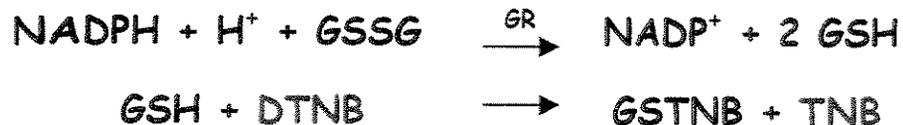
onde B é a absorvância de 20  $\mu\text{L}$  da solução de DTNB em 1 mL de tampão, a é o volume total adicionado na cubeta (1,07 mL) e b é o volume de plasma.

#### **4. Biomarcadores da atividade do sistema de defesa antioxidante**

As atividades das enzimas GR e CAT foram quantificadas em relação à concentração de Hb no hemolisado e determinadas em espectrofotômetro Beckman modelo 640 segundo o método de Drabkin (Beutler, 1975).

## a) Glutathione redutase sanguínea (GR)

Os ensaios foram realizados de acordo com Smith et alii (1988). O princípio do método é baseado na redução do DTNB com consequente aumento na absorvância a 412 nm:

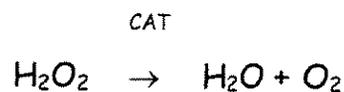


Ao meio de incubação contendo tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 M e EDTA 1 mM em pH 7,5 foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de DTNB 3 mM,  $\text{H}_2\text{O}$  para completar o volume de 1 mL e NADPH 100  $\mu\text{M}$ . Após todas estas adições, foi feita a leitura do branco. O hemolisado (5  $\mu\text{L}$ ) e GSSG 20 mM (50  $\mu\text{L}$ ) foram misturados para iniciar a reação. Por esta metodologia a velocidade da reação é linear por 3 minutos. Assim, a medida da atividade da GR se dá através da velocidade com que o DTNB é reduzido pela GSH, provocando um aumento no valor da absorvância a 412 nm.

Para o cálculo da atividade da enzima no sangue é utilizada a seguinte equação:  $E = 100 \times A / [\text{Hb}]$ , onde E é a atividade em unidades internacionais (UI)/grama de hemoglobina, A é o número de unidades de enzima da amostra e é calculada pela equação:  $\Delta A / 13.600 \times V_h / V_c$ , onde  $\Delta A$  é a diferença da absorvância a 412 nm em 1 minuto,  $13.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  é o coeficiente de extinção do TNB a 412nm,  $V_h$  é o volume de hemolisado na cubeta,  $V_c$  é o volume total adicionado na cubeta e  $[\text{Hb}]$  é a concentração de hemoglobina do hemolisado em g/dL (Beutler, 1975).

## b) Catalase (CAT)

Os ensaios da amostra de hemolisado foram realizados de acordo com Aebi (1984). O meio básico de reação contém tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 10 mM. A medida da atividade da CAT se dá através da velocidade com que o  $H_2O_2$  é reduzido pela ação da enzima, provocando uma diminuição no valor da absorvância em 240nm. A diferença na leitura das absorvâncias a 240 nm, em um determinado intervalo de tempo, nos permite determinar a velocidade de redução do  $H_2O_2$ , que é proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT.



O cálculo da atividade da catalase sangüínea é feito pela seguinte equação:  $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$ , onde a é o volume total adicionado na cubeta e b é a concentração de Hb em g/L,  $A_1$  o valor da absorvância em  $t=0$  e  $a_2$  é o valor da absorvância no tempo final, que em nosso caso se dá aos 15 segundo após o início da reação.

## 5. Dosagem da atividade da Creatina Kinase e concentração de Hemoglobina e ácido úrico no sangue total

Uma alíquota de 32  $\mu$ L do sangue total foi utilizada para análise da atividade da enzima CK e concentrações de Hb e ácido úrico até no máximo 5 horas após sua coleta. Todas as dosagens foram realizadas através de fitas reativas pelo aparelho REFLOTRON (Böehringer Mannheim). O aparelho

REFLOTRON mede reflectometricamente a variação de cor que acontece durante a reação na fita reativa através de uma esfera de Ulbrich. Esta esfera regula o comprimento de onda e a compensação do zero de acordo com a dosagem a ser realizada. Todas as informações específicas a respeito da dosagem executada estão contidas num código magnético na própria fita reativa, que é lido automaticamente pelo aparelho antes de iniciar a dosagem da amostra, propriamente dita.

**a) Creatina quinase(CK).**

A determinação da concentração da enzima foi realizada segundo o princípio abaixo (Braun et alii, 1988):



Faixa de sensibilidade: até 1400 U/L

**b) Hemoglobina Total (Hb).**

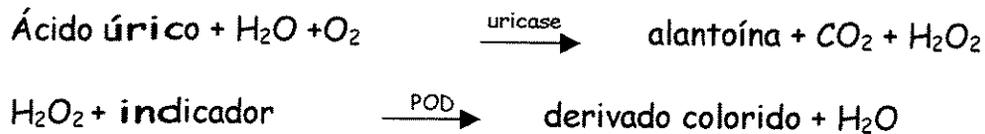
A análise da concentração de Hb foi realizada segundo o esquema abaixo (Van Assendelft,1970):



Faixa de sensibilidade: 5,0 - 20,0 g/dL

### c) **Ácido úrico (AU).**

A análise da concentração de ácido úrico foi realizada segundo o esquema (Merdes et alii, 1985):



Faixa de sensibilidade: 2,0 - 20,0 mg/dL

## 6. Dosagem da concentração de lactato sanguíneo

As dosagens de lactato sanguíneo foram feitas com auxílio do aparelho portátil lactímetro Accusport (Böehringer Mannheim) que também opera através de fitas reativas específicas.

## 7. Análise estatística

Os dados foram descritos como mediana, 1º e 3º quartis e valores mínimo e máximo. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar os parâmetros entre os grupos estudados. O nível de significância adotado foi de 5%.

## Resultados e Discussão

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de tabelas e gráficos de modo a facilitar a comparação dos dados entre os 3 grupos de indivíduos analisados. Aplicou-se análise estatística não paramétrica pelo fato de a  $\text{SatO}_2$  ser medida em porcentagem, além da idade dos indivíduos analisados variar entre 40 e 80 anos, não se podendo prever o comportamento das variáveis. Neste caso, os valores de média e desvio padrão não são adequados pois são afetados de forma exagerada pelos valores extremos. Por este motivo, para a discussão dos dados usamos os valores da mediana (50%) e intervalos interquartis (25% e 75%) dos valores obtidos, os quais podem ser localizados através das linhas horizontais nos gráficos.

### **CARACTERIZAÇÃO DAS ADAPTAÇÕES NOS SISTEMAS DE DIFUSÃO, TRANSPORTE E UTILIZAÇÃO DE $\text{O}_2$ EM FUMANTES E PACIENTES COM DPOC**

A Tabela I mostra os dados de porcentagem de saturação arterial de  $\text{O}_2$  na hemoglobina ( $\%\text{SatO}_2$ ), concentração de hemoglobina no sangue total e concentração de lactato sanguíneo para os três grupos analisados: não fumantes (NF), fumantes (F) e pacientes com DPOC (DPOC) com indicação para o início do tratamento de oxigenioterapia.

**Tabela I.** Efeito do cigarro e da hip crônica sobre biomarcadores dos sistemas de difusão, transporte e utilização de O<sub>2</sub>.

Parâmetros Analisados	Grupo Não fumante	Grupo Fumante	Grupo DPOC
n	23	14	21
Sat. O <sub>2</sub> (%)	97,0 (96,0 - 97,0)	96,5 (96,0 - 97,0)	80,3 * (66,0 - 86,5)
n	20	12	16
Lactato (mmol.L <sup>-1</sup> )	2,0 (1,8 - 2,5)	2,1 (2,0 - 3,2)	2,7 * (2,2 - 3,2)
n	34	11	21
Hemoglobina (mg.dL <sup>-1</sup> )	15,5 (14,7 - 16,6)	16,7 * (15,8 - 18,4)	17,4 * (14,7 - 19,0)

Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil entre parênteses. \* ( $p < 0,05$ )

Podemos observar claramente que somente no grupo DPOC ocorreu um regime de hipóxia, com diminuição significativa em relação aos grupos NF e F na %SatO<sub>2</sub>. Para o grupo NF e F praticamente não foram detectados diferenças nesses valores. Esses resultados são esperados, uma vez que somente pacientes com SatO<sub>2</sub> < 89% recebem indicação para oxigenioterapia.

Os dados da Tabela I mostram que esse regime de hipóxia induz duas adaptações metabólicas importantes nos pacientes. Uma delas é o aumento significativo na concentração de lactato sanguíneo, quando comparado ao grupo NF. De fato, há resultados mostrando que quando a obstrução aérea é severa ou prolongada pode-se desenvolver uma acidose celular (Rabbat et alii, 1998). A elevação nos níveis de lactato geralmente reflete a hipoxemia do tecido e um metabolismo predominantemente anaeróbio. Uma hipótese para explicar o aumento na concentração de lactato seria sua produção pelos músculos

respiratórios, que estariam sob fadiga devido ao aumento do trabalho inspiratório e expiratório (Roussos, 1990).

A outra adaptação observada foi o aumento significativo na concentração de Hb para o grupo DPOC quando comparado ao grupo NF. Pacientes com DPOC têm frequentemente cianose e uma baixa saturação de oxigênio nas hemoglobinas, conforme mostrado acima. Nos pacientes com enfisema pulmonar e bronquite crônica a hipoxemia pode ser significativa e muitos deles desenvolvem um aumento compensatório no volume de células vermelhas (Erslev, 1995). Este aumento é normalmente expresso em termos de uma eritrocitose, também conhecido como policitemia secundária. Este é um termo usado para descrever um grupo de mudanças caracterizadas por um aumento na massa de células vermelhas como consequência de um aumento na sua produção. O objetivo deste aumento seria compensar a falta de oxigênio, minimizando a hipóxia tecidual. Porém, como nos pacientes a hipóxia é persistente, na verdade o que pode estar ocorrendo é um aumento mais acentuado na "reperfusão" tecidual, mas sem a resolução do problema.

Na literatura existem trabalhos mostrando que mesmo entre pacientes com aumento no volume de células vermelhas, a concentração de hemoglobina e hematócrito não estão sempre aumentadas (Gallo et alii, 1964). Isto pode ser atribuído a um aumento concomitante no volume plasmático (Shaw & Simpson, 1961). Porém, no nosso trabalho o aumento observado na concentração de Hb no sangue do grupo DPOC pode ser explicado pelo fato destes pacientes apresentarem policitemia secundária com aumento concomitante na concentração de Hb no sangue total.

Os dados do grupo F mostram que estes indivíduos não sofrem alterações significativas quando comparados a aqueles do grupo NF para a

%SatO<sub>2</sub> e concentração de lactato sanguíneo. Entretanto, na Tabela I podemos observar um aumento significativo na concentração de Hb no grupo F, quando comparado ao grupo NF, que também poderia ser atribuído à policitemia secundária. Esse diagnóstico de policitemia aconteceu em fumantes crônicos que possuem função respiratória normal. Sugere-se que essa adaptação seria conseqüência de um aumento na concentração de carboxihemoglobina, resultante da inalação do monóxido de carbono (CO) do cigarro. Foi demonstrado que essa policitemia secundária dos fumantes era parcialmente corrigida quando estes indivíduos paravam de fumar e a concentração de carboxihemoglobina na circulação voltava ao normal (Smith & Landaw, 1978).

### CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO AO GRAU DE ATIVIDADE FÍSICA

A figura 5 mostra as atividades da enzima creatina quinase (CK) no sangue dos 3 grupos analisados. A enzima creatina quinase pode ser utilizada como diagnóstico de problemas musculares, pois é uma enzima especificamente intramuscular (músculos esqueléticos e cardíaco). A determinação de sua concentração no sangue reflete portanto, ou níveis aumentados de lesão, ou níveis diminuídos de atividade muscular.

Podemos observar que entre os grupos NF e F não aparecem diferenças significativas. Porém, quando comparamos os grupos NF e F com o grupo DPOC observamos uma concentração significativamente menor de CK para o grupo DPOC. No presente estudo foram excluídos voluntários que praticavam exercícios regularmente e ainda assim encontramos uma diferença significativa na atividade da enzima creatina quinase entre os grupos DPOC e

os outros dois grupos. Nossa interpretação é que esses dados indicam a dificuldade desses pacientes se locomover devido à falta de oxigênio tecidual.

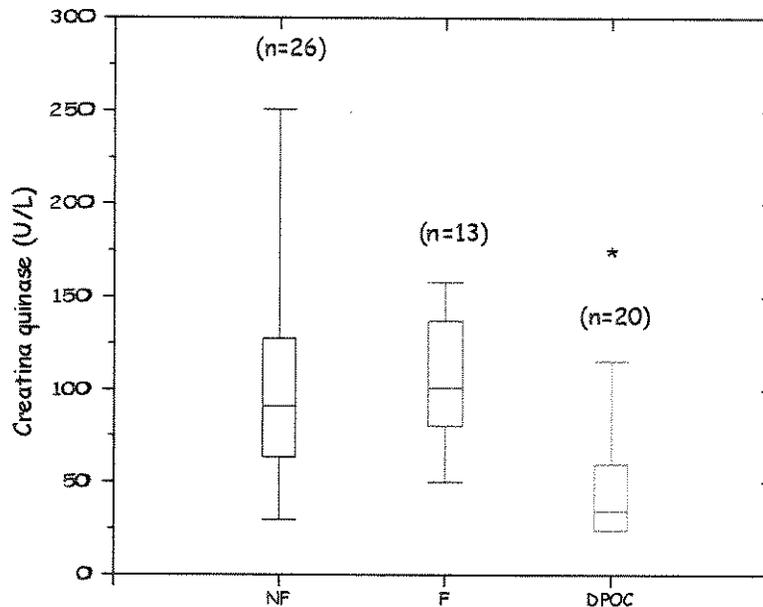


Figura 5: Representação gráfica da comparação da atividade de creatina quinase no sangue dos grupos não fumante (NF), fumante (F) e paciente (DPOC). Os dados foram apresentados como mediana, 1º e 3º quartis e valores mínimo e máximo. Os valores entre parênteses representam o número de indivíduos no grupo. \* ( $p < 0,05$ )

No seu conjunto, esses dados mostram que a concentração de hemoglobina significativamente aumentada, na tentativa de melhorar o aporte de  $O_2$  para os tecidos e o menor grau de atividade física dos pacientes devem contribuir para o aumento pequeno, embora significativo, do lactato proveniente de músculos esqueléticos.

## CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO CIGARRO E HIPÓXIA CRÔNICA SOBRE BIOMARCADORES DE ATAQUE OXIDATIVO A PROTEÍNAS E LIPÍDEOS.

Utilizamos neste trabalho três biomarcadores de ataque oxidativo. Um deles marcando ataque oxidativo a lipídeos e dois a proteínas. Utilizamos dois biomarcadores de ataque oxidativo a proteínas devido aos estudos serem mais escassos na literatura. Assim, os dados da Tabela II mostram os resultados obtidos sobre a determinação das concentrações de proteínas carboniladas, grupamentos sulfidríla livres e substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) para os três grupos de indivíduos estudados.

**Tabela II.** Efeitos do cigarro e Hipóxia Crônica sobre biomarcadores de ataque oxidativo a proteínas e lipídios.

Parâmetros Analisados	Grupo Não fumante	Grupo Fumante	Grupo DPOC
n	19	9	16
Prot. Carbonilada $\mu\text{mol. mL}^{-1}$	69 (60 - 88)	67 (52 - 63)	68 (51 - 81)
n	11	6	-
TBARs $\text{nmol. mL}^{-1}$ plasma	2,24 (1,71 - 2,53)	2,31 (1,30 - 2,65)	-
n	19	9	10
Grupos sulfidríla $\mu\text{mo. L}^{-1}$	488,6 (447,7 - 517,0)	421,8 * (380,9 - 453,6)	305,5 ** (283,0 - 347,0)

Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil entre parênteses. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,001$ )

Podemos observar entre os biomarcadores de ataque oxidativo a proteínas, que a quantificação de proteínas carboniladas no plasma não apresentou diferença significativa entre os grupos NF, F e DPOC. Concordando com nossos resultados, Rahman et alii (1996) não mostraram diferenças significativas na concentração de proteínas carboniladas entre os grupos NF, F e DPOC. Brown et alii (1996) estudando pacientes portadores de fibrose cística também não mostraram diferenças significativas na concentração de proteínas carboniladas no plasma quando compararam pacientes com disfunção pulmonar leve e pacientes portadores de disfunção pulmonar severa. Esses dados sugerem que a maioria das proteínas que foram carboniladas por EROs podem estar sendo rapidamente degradadas por proteases (Wolff & Dean, 1986), não se constituindo um biomarcador eficiente de ataque oxidativo a proteínas, pelo menos nesse modelo experimental. Esta interpretação é reforçada pelos trabalhos de Cross et alii (1993) e Eiserich et alii (1995), que encontraram um aumento na concentração de proteínas carboniladas somente com a exposição direta do plasma à fumaça de cigarro.

Quando analisamos a concentração de grupamentos sulfidrila livres no plasma dos três grupos estudados verificamos diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparamos os grupos F e DPOC com o grupo NF. Podemos observar que o grupo F possui uma concentração de grupamentos sulfidrila significativamente menor que o grupo NF. Já no grupo DPOC essa diferença é muito mais evidente ( $p < 0,001$ ), mostrando que este grupo possui concentração de grupamentos sulfidrila livres ainda menor que o grupo F. Estes dados indicam claramente que o hábito de fumar, acentuado pela instalação de uma condição de hipóxia persistente induz um maior ataque oxidativo, caracterizado pela oxidação de grupos sulfidrila livres, que portanto diminuem.

É interessante notar que esse ataque oxidativo a proteínas não pode ser detectado quando analisamos somente a concentração de proteínas carboniladas plasmáticas.

Através da análise da concentração de grupos sulfidrila livres, vários autores já citados acima mostraram resultados que concordam com os nossos. Cross et alii (1993) e Eiserich et alii (1995) mostraram que a exposição direta do plasma à fumaça de cigarro induz diminuição na concentração de grupos SH. No estudo com pacientes portadores de fibrose cística com disfunção pulmonar leve e severa a concentração de grupos SH foi menor no grupo com disfunção pulmonar severa (Brown et alii, 1996). Além disso, Rahman et alii (1996) mostraram diferenças significativas na concentração de grupamentos sulfidrila livres entre NF e DPOC. Todos esses resultados sugerem que a concentração de grupos sulfidrila livres é um biomarcador eficaz do ataque oxidativo.

Um dos objetivos deste trabalho foi analisar a peroxidação lipídica induzida pelo hábito de fumar e pela obstrução respiratória crônica e para isso fizemos a determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) no plasma. Existem trabalhos que mostram um aumento significativo na concentração de TBARs no plasma de fumantes em relação aos não fumantes. Este aumento pode ser justificado levando-se em conta o grande número de espécies produtoras de radicais livres encontrados no cigarro (Pryor et alii, 1983; Church et al, 1985). Entretanto, os dados obtidos na literatura ainda não são conclusivos, devido às várias divergências encontradas em relação a estas dosagens (Nadiger et alii, 1987; Duthie et alii, 1989; Liu et alii, 1998).

Nossas análises foram realizadas apenas nos grupos NF e F e entre esses grupos não houve diferença significativa. Na literatura encontramos autores que confirmam nossos dados (Duthie et alii, 1989; Duthie et alii, 1993; Marangon et alii, 1998). Por sua vez, estudos analisando a concentração de TBARs no plasma de indivíduos fumantes e não fumantes mostraram que os indivíduos que eram fumantes há menos de dez anos apresentaram maior concentração de TBARs no plasma que o grupo não fumante. Já nos indivíduos que eram fumantes há mais de dez anos a diferença na concentração de TBARs não foi significativa quando comparada ao grupo não fumante (Nadiger et alii, 1987). Estes achados também parecem concordar com nossos dados, já que o nosso grupo F era formado por indivíduos que fumavam há mais de 10 anos. Em outro trabalho recente os autores mostraram um aumento na concentração de TBARs somente em fumantes com idade acima de 45 anos, sendo que em fumantes com menos de 45 anos a diferença não foi significativa em relação ao grupo não fumante (Liu et alii, 1998).

Resumindo, embora dois dos biomarcadores de ataque oxidativo utilizados neste trabalho não tenham registrado diferenças significativas, a diminuição na concentração de grupos sulfidrilas livres indicam um maior ataque oxidativo para ambos os grupos analisados, fumantes e pacientes com DPOC.

## CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO CIGARRO E HIPÓXIA CRÔNICA SOBRE O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Os dados apresentados anteriormente indicaram um aumento no ataque oxidativo, derivado tanto do aumento na produção de EROs pelos oxidantes presentes no cigarro quanto pela sua formação aumentada devido à situação de hipóxia induzida pela obstrução respiratória crônica. Fomos investigar se, além de um aumento na formação de EROs, também havia uma diminuição na atividade do sistema de defesa antioxidante, com o objetivo de registrar qual situação induziria um maior nível de estresse oxidativo ao organismo.

Os dados da Tabela III mostram a atividade das enzimas catalase (CAT) e glutatona redutase (GR) e a concentração de ácido úrico como integrantes do sistema de defesa antioxidante nos três grupos de indivíduos estudados.

**Tabela III.** Efeitos do cigarro e Hipóxia Crônica sobre o sistema de defesa antioxidante

Parâmetros Analisados	Grupo Não fumante	Grupo Fumante	Grupo DPOC
n	25	16	23
Catalase k.gHb <sup>-1</sup>	0,355 (0,294 - 0,393)	0,407 (0,352-0,466)	0,310 * (0,230 - 0,364)
n	22	12	17
Glutaciona redutase U.gHb <sup>-1</sup>	12,2 (11,3 - 13,6)	14,2 (12,1 - 15,5)	13,5 (10 - 14,3)
n	34	20	22
Ácido Úrico mg.dL <sup>-1</sup>	6,41 (5,57 - 6,94)	5,41 * (4,29 - 6,38)	6,24 (4,49 - 7,22 )

Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil entre parênteses. \* (p<0,05)

Podemos observar que o grupo DPOC possui atividade significativamente menor da enzima catalase quando comparado ao grupo NF ( $p < 0,05$ ). Esta diminuição não foi significativa quando comparamos os grupos NF e F. Este resultado também foi demonstrado por Duthie et alii (1991) em trabalho com fumantes e não fumantes. Por outro lado, se observarmos os dados da mediana dos grupos, podemos verificar que eles tendem a ser inclusive mais altos que o grupo NF. Isto talvez explique o menor nível de ataque oxidativo encontrado no grupo F, quando comparado ao grupo DPOC (Tabela II).

Há estudos mostrando um aumento na concentração de  $H_2O_2$  exalado em sujeitos com DPOC, em relação aos sujeitos controle, evidenciando aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas vias aéreas destes pacientes. Este aumento na produção de  $H_2O_2$  pode ser causado pelo aumento do número de células inflamatórias ou pelo aumento da produção de  $H_2O_2$  por estas células (Dekhuijzen et alii, 1996). Como a catalase é uma enzima básica na regulação dos níveis de  $H_2O_2$ , nossos resultados podem explicar esse aumento observado.

A comparação da atividade enzimática da GR nos grupos NF, F e DPOC não mostrou diferenças significativas entre os 3 grupos. Estes dados estão melhor visualizados na Figura 6.

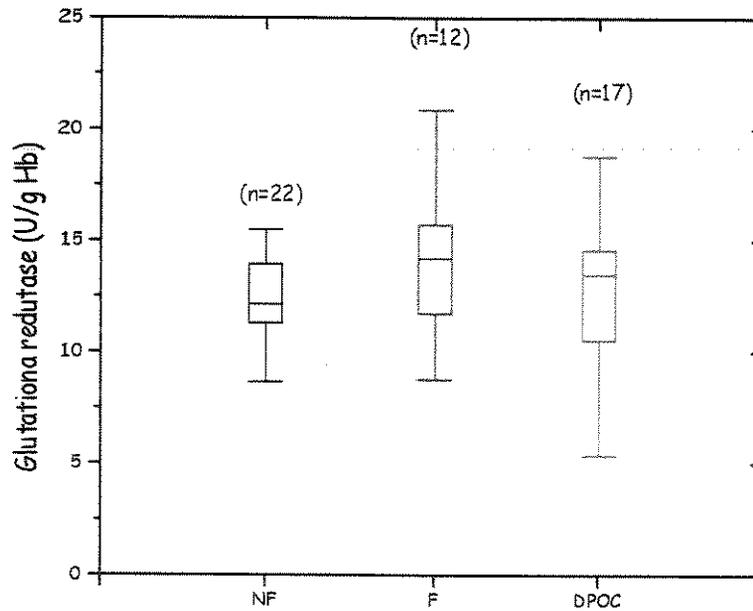


Figura 6: Comparação da atividade da enzima glutathione redutase entre os grupos não fumante (NF), fumante (F) e paciente (DPOC). Os dados foram apresentados como mediana, 1º e 3º quartil e valores mínimo e máximo. Os valores entre parênteses representam o número de indivíduos no grupo. \* ( $p < 0,05$ ).

Na literatura existem poucos trabalhos mostrando a atividade desta enzima em fumantes ou pacientes com DPOC. Entretanto, Duthie et alii (1991) mostraram que a atividade da enzima glutathione peroxidase não era significativamente alterada entre fumantes e não fumantes. Podemos supor que a atividade da enzima glutathione redutase também não seria afetada já que estas duas enzimas são dependentes entre si, pois pertencem ao mesmo sistema responsável pela manutenção dos níveis de glutathione reduzida. Estes dados concordam com os dados por nós encontrados. Outros trabalhos mais recentes também não mostraram diferenças significativas nas atividades destas enzimas entre fumantes e não fumantes (Leonard et alii, 1995; Durak et alii, 1999). Smith et alii estudaram a atividade destas enzimas nas células

pulmonares de pacientes com asma e também não encontraram alterações nas atividades das enzimas antioxidantes (Smith et alii, 1997).

A diminuição na concentração de grupos sulfidrilas livres observada na Tabela II pode ser atribuída à uma diminuição na concentração de glutathiona reduzida (GSH) (Roum et alii, 1993), como consequência de sua oxidação. Como neste estudo não observamos nenhuma diferença significativa na atividade da enzima glutathiona redutase entre os 3 grupos, este fato poderia explicar a diminuição na concentração de grupos sulfidrilas livre mostrados na Tabela II, pois esta enzima é uma das principais responsáveis pela manutenção do equilíbrio GSH/GSSG celular.

Existem propostas na literatura que sugerem que a presença de ácido úrico no plasma seria um mecanismo protetor, selecionado pela evolução, contra o ataque de EROs e uma diminuição na sua concentração poderia indicar um maior ataque oxidativo a esta molécula (Ames et alii, 1981). Nossos dados mostram que não houve diferenças significativas entre os grupos NF e DPOC, porém no grupo F a concentração de ácido úrico estava significativamente menor que no grupo NF. Estes resultados são contraditórios com a maioria dos trabalhos da literatura, que não mostram diferenças significativas na concentração de ácido úrico de fumantes e não fumantes (Duthie et alii, 1989; Duthie et alii, 1993; Liu et alii, 1998). Porém, Eiserich et alii (1995) relataram que quando o plasma sanguíneo era exposto à fase gasosa do cigarro, ocorria a depleção de ácido úrico e glutathiona.

O ácido úrico parece ser um eficiente seqüestrador de oxigênio singlete, radicais peroxil e radicais hidroxila (Halliwell & Gutteridge, 1989). A diminuição na concentração de ácido úrico apresentado pelo grupo F sugere que esta molécula esteja sendo oxidada, agindo como um antioxidante "in vivo" para

os radicais gerados principalmente pela fase gasosa do cigarro. Já o grupo de pacientes, no estágio de hipóxia crônica em que se encontram há um aumento na concentração de ácido úrico pela reação da adenilato quinase e neste caso, não foram observadas alterações significativas na concentração de ácido úrico quando comparados ao grupo NF, reforçando a interpretação de um efeito antioxidante específico do ácido úrico para radicais. O aumento na concentração de ácido úrico seria melhor detectado se fosse feito um teste de "clearance" de fosfato na urina dos pacientes.

## CONCLUSÕES

Os dados apresentados nesta tese mostram que o hábito de fumar aumenta o nível de estresse oxidativo no organismo, que se acentua com a hipóxia persistente, característica da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Esta interpretação pode ser melhor visualizada quando analisamos a Figura 7 (A e B), que mostra a razão entre ataque oxidativo e defesa antioxidante, obtida dividindo-se os dados da mediana dos grupos de ataque oxidativo (representado pela concentração de grupamentos sulfidríla) pelos das enzimas da defesa antioxidante (GR, Figuras 7A e CAT, Figuras 7B). Desta forma, quanto maior o nível de estresse oxidativo, menor a razão obtida:

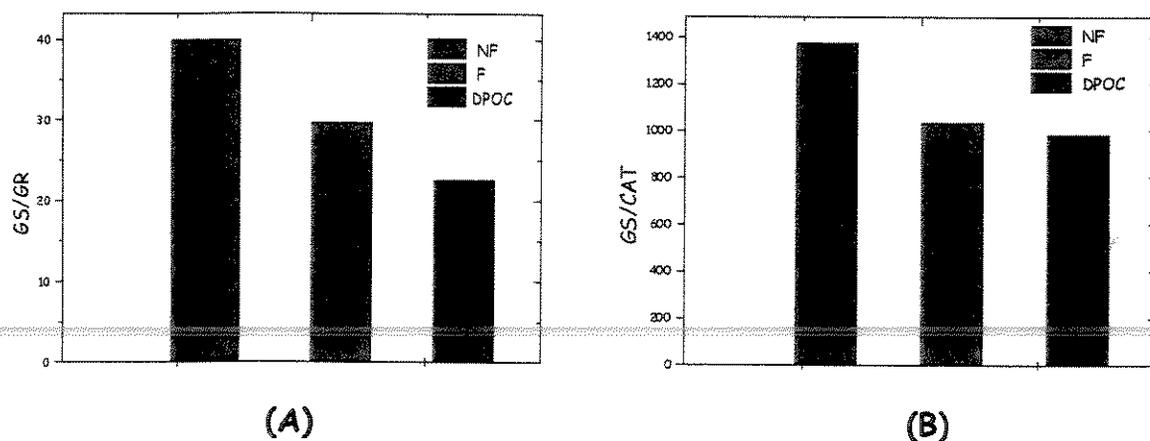


Figura 7: Razão ataque oxidativo/defesa antioxidante

Podemos observar claramente uma diminuição nesta razão em consequência principalmente, de uma diminuição na atividade do sistema de defesa antioxidante. Esses dados nos permitem propor que a terapia antioxidante deveria preceder a indicação da oxigêniooterapia, último recurso

de tratamento disponível, com o objetivo, principalmente de preservar ou aumentar a atividade do sistema enzimático de defesa.

Acreditamos que caracterização dos níveis de estresse oxidativo por biomarcadores moleculares da população de Campinas e Região que recebe tratamento no Ambulatório de Pneumologia do HC-Unicamp antes do início do tratamento de oxigenioterapia, comparada a um grupo de indivíduos não fumantes e fumantes contribuiu com o trabalho conjunto realizado por este Laboratório e o Departamento de Pneumologia do HC-Unicamp pois permitirá:

- Acompanhar a evolução destes mesmos parâmetros ao longo do tratamento de oxigenioterapia, trabalho que já está em andamento em nosso laboratório (Soraya El Khatib, Tese de Doutorado) de uma maneira muito mais criteriosa;
  - Acompanhar o efeito de diferentes terapias antioxidantes propostas na literatura em diferentes etapas da evolução da doença e do tratamento com oxigênio, afim de verificar sua eficácia e melhor momento de iniciá-la.
-

## Referências Bibliográficas

- ADLER, K.B., HOLDEN-STAUFFER, W.J. AND J.E, REPINE. Oxygen metabolites stimulate release of high molecular weight glycoconjugates by cell and organ cultures of rodent respiratory epithelium via an arachidonic acid-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* **85**: 75-85, 1990.
- AEBI, H. Catalase. *Meth. Enzymol.* **105**: 121-126, 1984.
- AMES, B.N., CATHCART, R., SCHWIERS, E. and HOCHSTEIN, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:6858-6862, 1981.
- ANTONINI, E. and BUNORI, M. Hemoglobin and Myoglobin in their reaction with ligands. Amsterdam, North Holland, 1971.
- ARCHER, S.L., PETERSON D., NELSON D.P., DeMASTER E.G., KELLY B. EATON, J.W. and WEIR, E.K. Oxygen radicals and antioxidant enzymes alter pulmonary vascular reactivity in the rat lung. *J. Appl. Physiol.* **66**: 102-111, 1989.
- ARUOMA, O.I. and HALLIWELL, B. Molecular Biology of free radicals in human diseases. OICA International, 1998.
- ASHI, M., FUJII, J., SUZUKI, K., et al. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide: implication for cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **270**: 21035 - 39, 1995.

- BENESCH, R. and BENESCH, R.E. The effect of organic phosphates from the human erythrocytes on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**: 162-167, 1967.
- BERNE, R.M. Adenosine: an important physiological regulator. *News Physiol. Sci.* **1**: 163-167, 1986.
- BEUTLER, E. : *Red Cell Metabolism* in: A manual of biochemical methods, 2<sup>o</sup> ed., Grune & Stratton publishers, London, 1975.
- BLAKE, D., WINYARD, P. G., editors. Immunopharmacology of free Radicals Species. Academic Press: London, 1995.
- BLOOM, W. and FAWCETT, D.W. A textbook of Histology. 11<sup>o</sup> ed., W.B. Saunders Company, 1986.
- BONE, R.C. Bronchiectasis. In: BENNETT, C, PLUM, F. (editors). *Cecil Textbook of Medicine*, 20<sup>th</sup> edition, p. 416 - 419, 1996.
- BONE, R.C. Cystic Fibrosis. In: BENNETT, C, PLUM, F. (editors). *Cecil Textbook of Medicine*, 20<sup>th</sup> edition, p. 419-422, 1996.
- BRAUN, H.P., DENEKE, U. and RITTERSDORF, W. Scientific program: American Association for Clinical Chemistry 39<sup>th</sup> national meeting. San Francisco, California. *Clin.Chem.* **33**:988, 1987.
- BRIDGES, R. B., FU, M. C. and REHM, S. R. Increased neutrophil myeloperoxidase activity associated with cigarette smoking. *Eur. J. Respir. Dis.* **67**: 84 - 93, 1985.
- BRIDGES, A.B., SCOTT, N.A., PARRY, G.J. and BELCH, J.J.F. Age, Sex, cigarette smoking and indices of free radical activity in healthy humans. *Eur. J. Med.* **2**: 205 - 208, 1993.
- BROWN, K. M., MORRICE, P. C. and DUTHIE, G. G. Vitamin E supplementation suppresses index of lipid peroxidation and platelet counts in blood of

smokers and nonsmokers but plasma lipoprotein concentrations remain unchanged. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 383 - 387, 1994.

BROWN, R.K., WYATT, H., PRICE, J.F. and KELLY, F.J. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *Eur. Respir. J.* 9:334-339, 1996.

BUI, M. H., SAUTY, A., COLLET, F. and LEUENBERGER, P. Dietary vitamin C intake and concentrations in the body fluids and cells of male smokers and nonsmokers. *J. Nutr.* 122: 312 - 316, 1992.

CARAFOLI, I.E. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 395-433, 1987.

CHAMBERS, D.E., PARKS, D.A., PATTERSON, G., ROY, R., McCORD, J.M., YOSHIDA, S., PARMLEY, L. and DOWNEY, J.M. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* 17: 145 - 152, 1985.

CHAN, P.H., SCHMIDELY, J.W., FISHMAN, R.A. and LONGAR, S.M. Brain injury, edema and vascular permeability changes induced by oxygen derived free radicals. *Neurology.* 34: 315 - 320, 1984.

CHURCH, D. F. and PRYOR, W. A. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implication. *Environ. Health. Perspect.* 64: 111 - 126, 1985.

COOBOLD, P.H. and RINK, T.J. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytosolic free calcium. *Biochem. J.* 248: 313-328, 1987.

COOK, J.D., FINCH, C.A. and SMITH, N.J. Evaluation of the iron status of a population. *Blood.* 48:449-455, 1976.

- COOPER, C.B., WATERHOUSE, J. and HOWARD, P. Twelve year clinical study of patients with hypoxic cor pulmonale given long term domiciliary oxygen therapy. *Thorax* 42(2): 105-110, 1987.
- CROSS, C.E., O'NEILL, A.O., REZNICK, A.Z., HU, M.L., MARCOCCI, L., PACKER, L. and FREI, B. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 686: 72 - 89, 1993.
- De LEYN, P., LERUT, T. and SCHREINEMAKERS, H. Adenine nucleotide degradation in ischemic rabbit lung tissue. *Am. J. Physiol.* 264: L329-L337, 1993.
- DEAN, R.T., GIESEG, S. and DAVIES, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 324:1-18, 1997.
- DEKHUIJZEN, P.N.R., ABEN, K.K.H., DEKKER, I., AARTS, L.P.H.J., WIELDERS, P.L.M.L., HERWAARDEN, C.L.A.V. and BAST, A. Increased Exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 154: 813-816, 1996.
- DeZWART, L.L., MEERMAN, J.H.N., COMMANDEUR, J.N.M. and VERMEULEN, N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.* 26:202-226, 1999.
- DRAZEN, J.M. Asthma. In: BENNETT, C, PLUM, F. (editors). *Cecil Textbook of Medicine*, 20<sup>th</sup> edition, p. 376-381, 1996.
- DURAK, I., YALCIN, S., BURAK, M.Y.C., BUYUKKOCAK, S., KACMAZ, M. and OZTURK, H.S. Effects of smoking on plasma and erythrocyte antioxidant defense systems. *J. Toxicol. Environ. Health.* 56: 373-378, 1999.
- DUTHIE, G.G., ARTHUR, J.R., JAMES, W.P. and VINT, H.M. Antioxidant status of smokers and nonsmokers: effects of vitamin E supplementation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 570: 435-438, 1989.

- DUTHIE, G.G., ARTHUR, J.R. and JAMES, W.P. Effects os smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am. J. Clin.Nutr.* **53**: 1061 - 1063, 1991.
- DUTHIE, G.G., ARTHUR, J.R., BEATTIE, J.A.G., BROWN, K.M., MORRICE, P.C., ROBERTSON, J.D., SHORTT, C.T., WALKER, K.A. and JAMES, W.P.T. Cigarette smoking, antioxidants, lipid peroxidation, and coronary heart disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **686**:120-129, 1993.
- EISERICH, J.P., VAN DER VLIET, A., HANDELMAN, G.J., HALLIWELL, B. and CROSS, C.E. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1490S-1500S, 1995.
- EPSTEIN, H.E. Mechanisms of disease. *New. England. J. med.* **312**: 159- 163, 1985.
- ERSLEV, A.J. Secondary polycythemia (erythrocytosis). In BEUTLER,E., LINEHTMAN,M.A., COLLER,B.S. and KIPPS, F.J. (editors). *Hematology*. 15<sup>th</sup> edition, 714-725, 1995.
- FELDMAN, C.R., ANDERSON, K.K., VARGAS,A., COLE, P.J. AND WILSON,R.Oxidant-mediate ciliary dysfunction.*Free.Rad.Biol.Med.* **17**: 1-10, 1994.
- FISHMAN, A.P. Update: Pulmonary diseases and disorders. Hightstown, NJ McGraw-Hill, 1992.
- FLETCHER, C. AND N.B. PRIDE. Definitions of emphysema, chronic bronchitis, asthma and airflow obstruction: 25 years on from the Ciba symposium. *Thorax.* **39**: 81-85, 1984.
- GALLO, R.C.,FRAIMOW,W., CATHCART. R.T. and ERSLEV, A.J. Erythropoietic response in chronic pulmonary disease. *Arch. Intern. Med.* **113**: 559, 1964.

- GARRISON, W.M. Radiation mechanisms in the radiolysis of the peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews* **87**:381-398, 1987.
- GRANGER, D.N., RUTILI, G., McCORD, J.M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. **81**: 22 - 29, 1981.
- GUNTER, T.E., GUNTER, K.K., SHEU S.S. AND GALVIN, E.C. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. Physiol. Soc.* C313-C339, 1994.
- GUTTERIDGE, J. M. C. Invited review free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence, *Free Rad. Res. Commun.*, **19**: 141-158, 1993.
- HALL, N.D. and GILLAN, A.H. Effects of antirheumatic drugs on protein sulphhydryl reactivity of human serum. *J. Pharm. Pharmacol.* **31**: 676, 1979.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* **16**:33-50, 1996.
- HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction, in: *Free Radicals Biology and Medicine* (B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge eds.) p. 188-1266, Oxford UK., 1989
- HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: na overview, *Meth. Enzymol.*, **186**: 1-85, 1990.
- HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J. M. C. Biologically relevant metal ion-dependent hidroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* **307**: 108-112, 1992.
- HARKEN, A.H. The surgical significance of the Oxyhemoglobin dissociation curve. *Surgery Gynec. Obstet.* **144**: 935-955, 1977.

- HEFFNER, J.A. and REPINE, J.E. State of the art: pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**: 531-554, 1989.
- HERMES-LIMA, M., STOREY, J.M. and STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol.* **120**: 437-448, 1998.
- HEVEL, J.M. and MARLETTA, M.A. Nitric-oxide synthase assays. *Meth. Enzymol.* **233**: 250-258, 1994.
- HODGKIN, J.E. and PETTY, T.L., Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Currents concepts. Philadelphia, W.B.Saunders Co., 1987.
- HU, M.L., Measurement of protein thiol groups and glutathine in plasma. *Meth. Enzymol.* **233**: 381-385, 1994.
- HUNNINGHAKE, C. W. and CRYSTAL, R. G. Cigarette smoking and lung destruction: accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* **128**: 833 - 838, 1983.
- IULIANO, L.; PEDERSEN, J. Z.; PRATICÒ, D.; ROTILIO, G.; VIOLI, F. Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur. J. Biochem* **221**: 695-704, 1994.
- JANOFF, A. Biochemical links between cigarette smoking and pulmonary enphysema. *J. Appl. Physiol.* **55**: 285-293, 1983.
- JONES, J.G, LAWER, P., CRAWLER, J.C.W., MINTZ, B.D., HULANDS, G. AND N.VEALL. Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. *Lancet.* **1**: 66-68, 1980.
- JORDAN, J. S. W.; GAIROLA, C. AND St. CLAIR, D. Protective role of manganese superoxide dismutase in cigarette smoke-induced cytotoxicity (abstract). *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Cancer Researchers.* **34**: A97, 1993.

- KNIGHT, J. A. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **25**: 111- 121, 1995.
- LAPENNA , D., DE GIORGIA, S., MEZZETII, A., CIOFANI, G., CONSOLI, A., MARZIO, L. and CUCCURULLO, F. Cigarette smoke, ferritin and lipid peroxidation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**: 431-435, 1995.
- LEBOWITZ, M.D. and POSTMA, D.S. Adverse effects of eosinophilic and smoking on the natural history of newly diagnosed chronic bronchitis. *Chest.* **108**: 55 - 61, 1995.
- LeMASTERS, J.J, DiGIUSEPPI, J., NIEMINEN, A.L. and HERMAN, B. Blebbing, free  $Ca^{2+}$  and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature.* **325**: 78-81, 1987.
- LEONARD, M.B., LAWTON, K., WATSON, I.D. and MACFARLANE, I. Free radical activity in young adult cigarette smokers. *J. Clin. Pathol.* **48**:385-387, 1995.
- LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**:464-478, 1990.
- LINDSAY, T., WALKER, P.M., MICKLE, D.A.G., ROMASCHIN, A.D. Measurement of hydroxy conjugated dienes after ischemia-reperfusion in canine skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **254**: H578 - H583, 1988.
- LIU, C.S., CHEN, H.W., LII, C.K., CHEN, S.C. and WEI, H. Alterations of small-molecular-weight antioxidants in the blood of smokers. *Chem. Biol. Interact.* **116**: 143-154, 1998.
- LOTITO, S.B. and FRAGA, C.G. (+)-catechin prevents human plasma oxidation. *Free Rad. Biol. Med.* **24**: 435-441, 1998.
- MARANGON, K., HERBERTH, B., LECOMTE, E., PAUL-DAUPHIN, A., GROELIER, P., CHANCERELLE, Y., ARTUR, Y. and SIEST, G. Diet,

antioxidant status, and smoking habits in frech men. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**:231-239, 1998.

MARCUS, A.J. and ZUCKER, M.B. The physiology of blood platelets. New York, Grune & Stratton, 1965.

MATTHAY, R.A. and ARROLIGA, A.C. Chronic airwais diseases. In: BENNETT, C, PLUM, F. (editors). *Cecil Textbook of Medicine*, 20<sup>th</sup> edition, p. 381-389, 1996.

MCcORD, J. M. and FRIDOVICH, I. Superoxido Dismutase; na enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049 - 55, 1969.

McCUSKER, K. and HOIDAL, J. Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophage from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**:678-682, 1990.

MERDES, H., RITTERSDORF, W. and WERNER, W. Annual meeting on clinical chemistry of the Deutsche Gesellschaft fur Klinische Chemie in Corporation with the Association of clinical biochemists and the Societe de Biologie Clinique. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **23**:608, 1985.

MEZZETTI, A., LAPENNA, D., PIERDOMENICO,S.D., CALAFIORE,A.M., COSTANTINE, F., and CUCCURULLO, F. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non smokers. *Atherosclerosis* **112**:91-99, 1995.

MORROW, J.D., FREI, B., LONGMIRE, A.W., GAZIANO, J.M., LYNCH, S.M., YU, S., STRAUSS, W., OATES, J.A. and ROBERTS, L.J. Increased in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers: smoking as a cause of oxidative damage. *N. Engl. J. Med.* **332**: 1198 - 1203, 1995.

- MURATA, A.; SHIRASKI, L.; FUKAZAKI, K.; KITTARA, T. AND ARADA, Y.  
Lower levels of vitamin C in plasma and urine of japanese male smokers.  
*Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **59**: 184-189, 1989.
- NADIGER, H.A, MATHEW, C.A. and SADASIVUDU, B. Serum malanodialdehyde (TBA reactive substance) levels in cigarette smokers.  
*Atherosclerosis* **64**: 71-73, 1987.
- NEPOMUCENO, M.F., ALONSO,A., PEREIRA-DA-SILVA,L. and TABAK,M.  
Inhibitory effect of dipyridamole and its derivates on lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **23**(7): 1046-1054, 1997.
- NEPOMUCENO, M.F., MAMEDE, M.E.O., MACEDO, D.V., ALVES, A.A., PEREIRA-DA-SILVA, L. and TABAK, M. Antioxidant effect of dipyridamole and its derivate RA-25 in mitochondria: correlations of activity and location in the membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1418**(2): 285-294, 1999.
- PERUTZ, M.F. Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.* **239**: 92, 1978.
- PETO, R., LOPEZ, A. D., BOREHAM, M., THUN, M. and HEATCH, C. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet.* **339**:1268-1278, 1992.
- POSTMA, D. S. T. E.; RENKEMA, J. ; NOORDHOEK, A.; FABER, H.; SLUITER, H. J. AND KAUFFMAN, H. Association between non-specific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic airflow obstruction. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**: 57 - 61, 1988.
- PRYOR, W.A., HALES, B.J., PREMOVIC, P.I. and CHURCH, D.F. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science.* **220**: 425 - 427, 1983.

- PRYOR, W.A., DOOLEY, M.D. AND D.F.CHURCH. The mechanisms of inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by gas phase cigarette smoke. *Free. Radic. Biol. Med.* **2**: 161-168, 1986.
- RABBAT, A., LAABAN J.P., BOUSSAIRI,A. and ROCHEMAURE,J. Hyperlactatemia during acute severe asthma. *Int. Care Med.* **24**: 304-312, 1998.
- RAHMAN, I., MORRISON, D., DONALDSON,K. and MacNEE, W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**:1055-1060, 1996.
- REPINE, J.E., BAST, A., LANKHORST, I. and The Oxidative Stress Study Group. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am.J.Respir.Crit. Care Med.* **156**: 341-357, 1997.
- RODRIGUEZ, R. J., WHITE, R. M. SENIOR & LEVINE, E. A. Elastase release from human alveolar macrophages: comparasion between smokers and nonsmokers. *Science.* **198**: 313 - 314, 1977.
- ROUM,J.H., BUHL, R., McELVANEY,N.G., BOROK, Z. and CRYSTAL,R.G. Systemic glutathione deficiency in cystic fibrosis. *J. Appl. Physiol.* **75**:2419-2424,1993.
- ROUSSOS, C. Respiratory muscle fatigue and ventilatory failure. *Chest.* **97**: 895- 955, 1990.
- RUUGE, E.K., LEDENEV, A.N., LAKONKIN, V.L., KONSTANTINOV, A.A. and KSENZENKO, M.Y. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* **261** : 81-86 suppl, 1991.
- RYTER, S.W., PACIFICI, R.E. and DAVIES, K.J.A. Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress. In: *Biological Oxidation Systems* p. 929-952, 1990.

- STUART-HARRIS, C., FLENLEY, D.C. and BISHOP, J.M. Long term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating bronchitis and emphysema. *Lancet* 1: 681-686, 1981.
- SUZUKI, J. Y.; FORMAN, H. J.; SEVANIAN, A.. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 269-285, 1997.
- TAYLOR, J. C., MADISON, R. and KOSINSKA, D. Is antioxidant deficiency related to chronic obstructive pulmonary disease? *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 285-289, 1986.
- TERZI, R.G.G. Equilíbrio ácido-básico e transporte de oxigênio. 1ª ed. São Paulo: Manole, 1992.
- THOMPSON, A.B. T. B.; HEIRES, A.; LINDER, J. AND RENNARD, S.I. Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smoking. *J. Lab. Clin. Med.* 117: 494 - 499, 1991.
- U.S. Department of Health and Human Service. The health consequences of smoking. Chronic obstructive lung disease. A report of the Surgeon General. DHHS publication nº 84-50205. Government Printing Office. Washington, DC. 1984.
- U.S. Department of Health and Human Service (DHHS). Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress. A report of the Surgeon General. Rockville. MD: Department of Health and Human Services. 1989. DHHS publication nº. (CDC) 89-8411.
- VAN ASSENDELFT, O.W. Spectrophotometry of hemoglobin Derivates, Royal van Gorem Ltd., Assen, Países Baixos, 1970.
- WEST, J.B. Pulmonary Pathophysiology: The Essentials. Baltimore, Williams & Wilkins Co. 1992.

WEST, J.B. *Pulmonary Physiology: The Essentials*. Baltimore, Williams & Wilkins Co. 1994.

WIELDERS, P.L. and DEKHUIJZEN, P.N. Disease monitoring in chronic obstructive pulmonary disease is there a role for biomarkers? *Eur. Respir. J.* 10: 2443-2445, 1997.

WOLFF, S.P. and DEAN, R.T. Fragmentation of polypeptides by free radicals and its effect on susceptibility to proteolysis. *Biochem. J.* 234:399-403, 1986.

YAGI, K. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 212-216, 1976.

ZORATTI, E. M.; SEDGWICK, R.F.V. AND BUSSE, W.W. The effect of platelet-activating factor on the generation of superoxide anion in human eosinophils and neutrophils. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 88: 749-758, 1991.

## ANEXO I

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA

CONSULTA No. 435/97-C.Ética

DATA: 27.10.97

ASSUNTO: "Estrutura e função da fibra muscular estriada esquelética em condições de hipoxemia severa e a resposta adaptativa à anaerobiase: estudo pré e pós-oxigenioterapia prolongada domiciliar"

INTERESSADO: Dra. Ilma Aparecida Paschoal

RELATOR: Dr. Plínio Trabasso

### PARECER

Consideramos que o protocolo referido acima, bem como seu Termo de Consentimento Pós-Informação obedecem os requisitos necessários para pesquisa. No entanto, deverão ser acrescentados os números de telefone de todos os pesquisadores e da Comissão de Ética Médica (7888004), caso o paciente necessite entrar em contato.

Esta Comissão manifesta-se favorável à realização do estudo.



Dr. Plínio Trabasso  
MEMBRO RELATOR



Prof. Dr. Sebastião Araújo  
PRESIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA  
HC/UNICAMP

## ANEXO II



### 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  
✉ cep@heada.fcm.unicamp.br

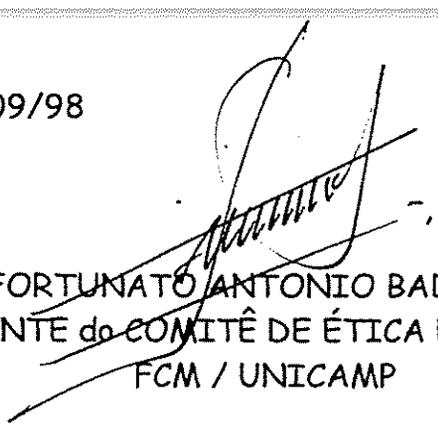
PARECER: Nº 120/98

**PESQUISA:** ESTRUTURA E FUNÇÃO DA FIBRA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA SOB CONDIÇÕES DE HIPOXEMIA SEVERA E A RESPOSTA ADAPTATIVA À ANAEROBIOSE: ESTUDO PRÉ E PÓS OXIGENIOTERAPIA PROLONGADA DOMICILIAR ( coleta de sangue da veia antecubital )

**PESQUISADORA:** Soraya El-Khatib

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após aprovação da Comissão de Ética Médica do HC da UNICAMP em 22/Abril/1996, referenda a pesquisa supracitada bem como o Consentimento Pós-Informação por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e 251/97.

CEP/FCM, 21/09/98



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

## Anexo III

### TERMO DE CONSENTIMENTO

Concordo em participar da pesquisa denominada "Estrutura e função da fibra muscular estriada esquelética em condições de hipoxemia severa e a resposta adaptativa à anaerobiose: estudo antes e após uso de oxigenoterapia prolongada domiciliar".

Serei submetido à coletas sanguíneas antes e depois do início do uso da suplementação de oxigênio. Este procedimento será feito com todos os cuidados de assepsia necessários e por profissional capacitado e habilitado. Será coletado 5 mL de sangue da veia antecubital com seringas e agulhas descartáveis.

Esta pesquisa não interferirá no meu tratamento habitual. Continuarei realizando exames periódicos e fazendo uso das medicações costumeiras.

Em caso de qualquer dúvida devo reportar-me ao Farmacêutico responsável ou Médico assistente através de um dos telefones fornecidos abaixo ou ao Serviço de Pneumologia do HC-Unicamp.

Nome: .....

HC: ..... RG: ..... Idade: .....anos

Endereço: .....

..... Telefone para contato: .....

Campinas, ...../...../.....

Assinatura do paciente: .....

Assinatura do Pesquisador responsável: .....

## Anexo IV

### TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, portador do R.G. nº: \_\_\_\_\_,

declaro concordar em participar como voluntário nos testes referentes ao trabalho de mestrado da aluna ANDRÉA FERREIRA MENDES CARMONA, do Instituto de Biologia - Departamento de Bioquímica - UNICAMP. Os quais serão conduzidos no Laboratório de Bioenergética sob orientação da Prof. Dra. Denise Vaz de Macedo.

Estou ciente de que os dados obtidos serão entregues em resumo após um período de tempo necessário para análise dos resultados. Declaro e concordo que os dados fornecidos serão utilizados exclusivamente com a finalidade de avaliar os parâmetros bioquímicos para compará-los com pacientes com DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.

Campinas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 1999

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Anexo V

---

### Comunicações em Congressos Nacionais

A. F. M. Carmona, L. Pereira da Silva and D. V. Macedo (1997) "The periferic benzodiazepine receptor is not involved on mitochondria permeability transition pore opening". XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq - Caxambu, MG.

A. F. M. Carmona, S. El-Khatib, I. A. Paschoal, L. Pereira da Silva e D.V. Macedo (1999) " Adaptações em biomarcadores de estresse oxidativo por tabagismo e em portadores de Insuficiência Respiratória Crônica". XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE - Caxambu, MG.

---