

# Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo

A.L.A. FERREIRA, L.S. MATSUBARA

Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP.

UNITERMOS: Radicais livres. Íons ferro. Lesões oxidativas. Estresse oxidativo. Defesa antioxidante.

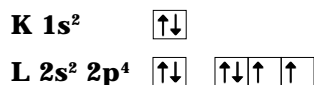
KEY WORDS: Oxygen species. Ions iron. Oxidative damage. Pulmonary injury.

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, etc. Ao abrirmos um periódico, com frequência, encontramos temas relacionados a radicais livres, que, por seu caráter multidisciplinar, têm atraído a atenção de pesquisadores de várias áreas. No entanto, os artigos desta linha de pesquisa, muitas vezes, causam desinteresse no leitor não-especializado, porque estão mergulhados num mundo bioquímico de difícil entendimento. O objetivo do presente artigo é fornecer conceitos importantes a esses leitores, com a finalidade de desmistificar o tema.

## O QUE É RADICAL LIVRE?

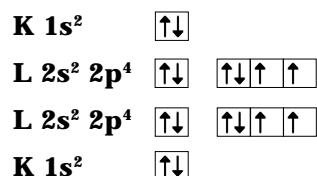
As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f. De maneira simples, o termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica<sup>1,2</sup>. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas.

Vamos acompanhar a formação de um radical livre, o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que é derivado do oxigênio molecular ( $O_2$ ). O  $O_2$  é composto por dois elementos oxigênio (O), cujo número atômico é 8, sendo sua distribuição de elétrons a seguinte:

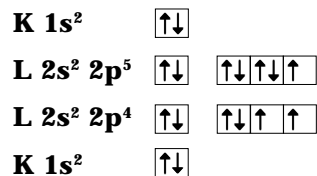


Para formar o oxigênio molecular ( $O_2$ ), os dois elétrons solitários do subnível p de um elemento

oxigênio fazem intercâmbio com os dois elétrons de outro elemento oxigênio, formando um composto estável com 12 elétrons na última camada (L). Assim:



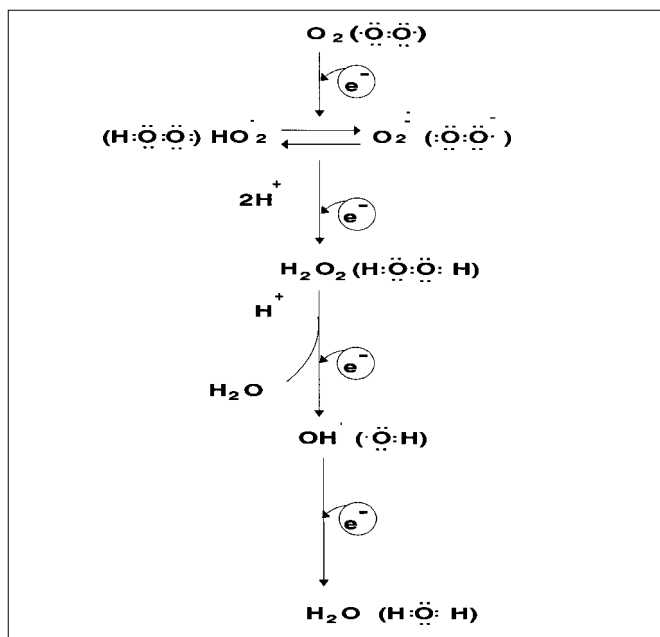
É conveniente recordar que reações de redução implicam em ganho de elétrons, e as de oxidação, em perda. Portanto, quando no metabolismo normal ocorrer uma redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ), este ganhará um elétron, formando o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), considerado instável por possuir número ímpar (13) de elétrons na última camada L. Assim, a configuração eletrônica do radical superóxido é a seguinte:



Compreendendo as etapas da formação de  $O_2^{\cdot-}$ , podemos verificar que os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução.

Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria são derivados do metabolismo do  $O_2$ , no decorrer deste texto utilizaremos o termo “espécies reativas do metabolismo do oxigênio” (ERMO) para referirmos a eles.

ERMO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na forma-



**Fig. 1** — Redução tetraeletrônica do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $H_2O$ ). Várias espécies reativas de  $O_2$  são formadas no processo. (Adaptado de Cohen MV<sup>3</sup>.)

ção de  $H_2O$  (fig. 1). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Normalmente, a redução completa do  $O_2$  ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ERMO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons<sup>3</sup>.

#### Radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ )

Pode ser escrito como  $O_2^{\bullet -}$  ou  $O_2^{\bullet -}$  e é formado após a primeira redução do  $O_2$ . O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos<sup>1,4</sup>. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de  $O_2^{\bullet -}$  (seja enzimático, fagocítico ou químico)<sup>1</sup>.

#### Radical hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ )

Representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas<sup>1</sup>.

#### Radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ )

É considerada a ERMO mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do  $OH^{\bullet}$  com metais ou outros radicais no próprio sítio

onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas ( $-SH$ ) a pontes dissulfeto ( $-SS$ ). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação)<sup>4</sup>.

#### Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o  $H_2O_2$  é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o  $OH^{\bullet}$  (fig. 1). O  $H_2O_2$  tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao  $Fe^{+5}$ . Assim, é altamente tóxico para as células; esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro<sup>6</sup>, como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional.

#### Oxigênio singlet ( $^1O_2$ )

É forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O  $^1O_2$  tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença<sup>1</sup>.

Embora as ERMO possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra a infecção, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir o microorganismo<sup>7,8</sup>. Contudo, poderão ocorrer vários eventos nosológicos, se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, e a ele estiver associada uma falha da defesa antioxidante (ver quadro na página seguinte).

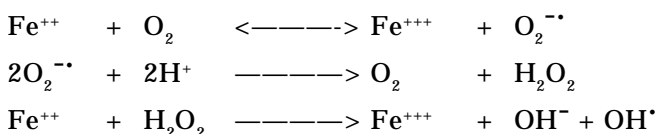
### IMPORTÂNCIA DO ÍON FERRO NA FORMAÇÃO DAS ERMO

O estudo sobre os mecanismos de lesão oxidativa tem, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a estas lesões. O papel dos metais na formação *in vitro* das ERMO é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss<sup>1,9,10</sup>. Embora o cobre possa também catalisar a reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas<sup>11</sup>. Como pode ser observado a seguir,

Quadro — Eventos relacionados a espécies reativas de O <sub>2</sub> *
Envelhecimento
Mutações
Câncer
Aterosclerose
Lesão por toxicidade de O <sub>2</sub> em pulmão e retina
Lesão pós-isquemia e reperfusão de cérebro, coração, pele, intestino, pâncreas, fígado, músculo, rins e pulmões
Lesão pós-concussão cerebral e pós-hipertensão intracraniana
Síndrome demencial
Disfunção renal pós-transplante
Artrite reumatóide
Hemocromatose transfusional
Doenças auto-imunes
Toxicidade decorrente da exposição a xenobióticos
*Adaptado de Halliwell B & Gutteridge JMC <sup>1</sup> ; Halliwell B <sup>2</sup> ; Cohen MV <sup>3</sup> .

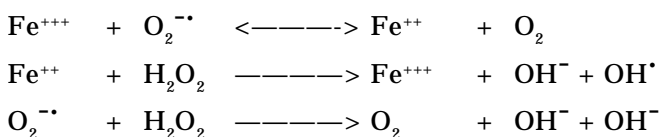
nas reações de Fenton e de Haber-Weiss são formados diferentes tipos de ERMO:

Reação de Fenton:



É sugerido que no traumatismo craniencefálico ocorram ERMO por mecanismo tipo Fenton. A liberação do ferro intracelular, a baixa capacidade líquórica de ligação ferro-proteína e a deficiência de enzimas antioxidantes no sistema nervoso central ampliam os riscos de lesão induzida pelo trauma<sup>2</sup>. O papel do ferro neste tipo de agressão é demonstrado pela diminuição da degeneração cerebral pós-trauma em animais experimentais que recebem quelante de ferro. É possível que a quelação do ferro liberado após o trauma iniba a formação de ERMO catalisadas por este metal<sup>1</sup>.

Reação de Haber-Weiss:



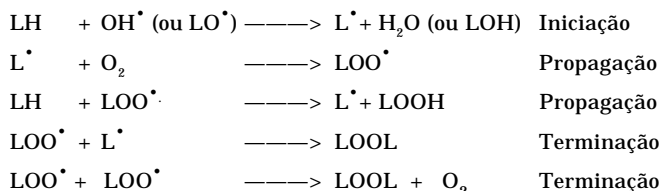
Experimentos *in vivo* sugerem que a síndrome da reperfusão pós-isquemia, em corações de ratos submetidos à sobrecarga de Fe<sup>+++</sup>, possa estar relacionada à produção de ERMO via reação de Haber-Weiss. Nesta situação, após a reperfusão, ocorre decréscimo da contratilidade miocárdica sem que se observe lesão tissular importante. Foi sugerido que o excesso de Fe<sup>+++</sup>, catalisando a reação de Haber-Weiss, promova o acúmulo de ERMO, dentre elas o OH<sup>·</sup>. O excesso de Fe<sup>+++</sup> e, conseqüentemente, de OH<sup>·</sup> estimula a lipoperoxidação de membranas, responsável pela diminuição da contratilidade miocárdica<sup>12</sup>.

Lesões teciduais associadas a sangramentos também podem liberar hemoglobina (Hb) e ferro, favorecendo reações oxirredutoras, como nos tumores e na artrite reumatóide, quando o ferro é liberado da Hb após microsangramentos<sup>1</sup>.

## LIPOPEROXIDAÇÃO

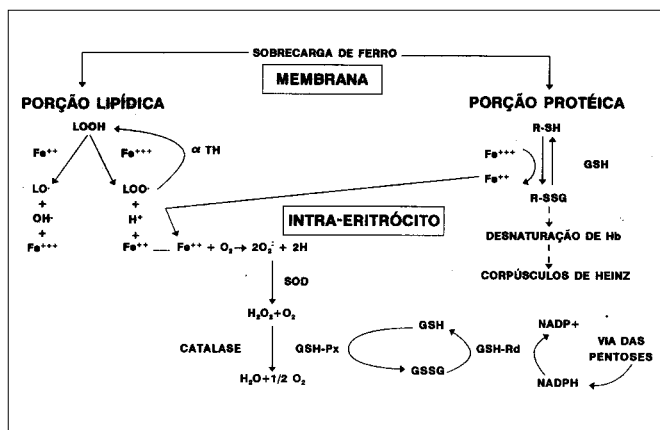
Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERMO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares<sup>13</sup>. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular<sup>14</sup>. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos<sup>15</sup>. Assim como na formação das ERMO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória<sup>1</sup>. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo<sup>16</sup>.

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio<sup>17</sup>:



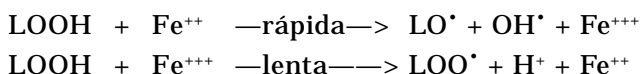
A reação acima inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH<sup>·</sup> ou pelo LO<sup>·</sup> (radical alcóxila), com conseqüente formação do L<sup>·</sup> (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o L<sup>·</sup> reage rapidamente com o O<sub>2</sub>, resultando em LOO<sup>·</sup> (radical peróxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o L<sup>·</sup> na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L<sup>·</sup> e LOO<sup>·</sup>) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios.

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcóxila, LO<sup>·</sup> e peróxila, LOO<sup>·</sup>), que, por sua vez, iniciam



**Fig. 2** — Mecanismo de lesão e proteção eritrocitárias na sobrecarga de ferro. A hemólise poderá ocorrer se a capacidade de defesa antioxidante for superada pela capacidade oxidativa do agente. (Adaptado de Gilbert HF & McLean VM<sup>27</sup>; Winterbourn CC<sup>40</sup>; Rice-Evans C et al.<sup>41</sup>.)

nova cadeia de reações, denominada ramificação. Essas reações, que podem ser rápidas ou lentas, dependem da valência do ferro<sup>18</sup>, a saber:



O radical hidroxila (OH•) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação<sup>10</sup>. Entretanto, estudos recentes indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessária uma relação equimolar Fe<sup>3+</sup> : Fe<sup>2+</sup> no meio, para que ocorra a lipoperoxidação<sup>19,20</sup>.

### SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as ERMO) e o sistema de defesa antioxidante (fig. 2). Como vimos, esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O<sub>2</sub> e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O<sub>2</sub><sup>16</sup>. Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutatona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutatona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutatona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E (α-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular<sup>16, 21</sup>.

Existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante. As lesões de reperfusão pós-isquemia de coração, rim, fígado e intestino são prevenidas por SOD, catalase ou allopurinol, sendo este último um bloqueador da produção de O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, pela via da xantina-oxidase<sup>15</sup>.

### Glutaciona reduzida (GSH)

A glutaciona reduzida (GSH, L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular<sup>22</sup>. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro<sup>23</sup>, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta<sup>24</sup>. Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão<sup>15</sup>; atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas<sup>24</sup>.

O poder antioxidante da GSH foi demonstrado pelo aumento da sobrevida de 90% de ratos submetidos à hiperoxia e tratados com instilação de eritrócitos na traquéia. Este resultado foi atribuído à GSH intra-eritrocitária, que protege contra o “pulmão de choque” induzido pelo estresse oxidativo resultante da hiperoxia<sup>25</sup>.

Quando comparado ao grupo controle, o nível de GSH está aumentado em pacientes com diabetes melito tipo II tratados com sulfonilurêia; é possível que isto se relacione com a disponibilidade de grupamentos -SH presentes no medicamento<sup>26</sup>.

### Glutaciona-redutase (GSH-Rd)

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG<sup>21</sup> (fig. 2). A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular<sup>27</sup>. Habitualmente, a reserva intracelular de GSH-Rd é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos<sup>28</sup>. A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses<sup>16</sup>. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GSH-Rd<sup>15</sup>.

*Glutathione-peroxidase (GSH-Px)*

A GSH-Px catalisa a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG<sup>15</sup> (fig. 2). Embora a GSH-Px tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana<sup>21</sup>.

Em modelo de hemocromatose experimental foi demonstrada redução de 36% na atividade da GSH-Px em fígado de ratos<sup>29</sup>.

*Catalase*

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  (fig. 2). É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado<sup>30</sup>. Sua atividade é dependente de NADPH<sup>5</sup>.

A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo  $H_2O_2$ , em eritrócitos humanos normais<sup>5</sup>, e também inibe as lesões oxidativas do DNA de timo de carneiros submetidos à sobrecarga de  $Fe^{+++}$ <sup>31</sup>. Em modelo de estresse oxidativo decorrente de agressão térmica, os eritrócitos exibem diminuição da atividade da catalase durante o processo hemolítico termodependente<sup>8</sup>.

*Superóxido-dismutase (SOD)*

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria. Esta enzima também tem papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , na presença do próton  $H^{+16,32}$  (fig. 2).

Durante o processo hemolítico decorrente de agressão térmica, os glóbulos vermelhos humanos<sup>8</sup> e bovinos<sup>33</sup> exibem queda da atividade SOD. A adição desta enzima também protege o DNA de lesões provocadas pela sobrecarga de  $Fe^{+++}$ <sup>31</sup>.

Além dos antioxidantes citados, a vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro. O  $\beta$ -caroteno interage com as ERMO especialmente quando ocorrem baixas tensões de  $O_2$ , enquanto que a vitamina E se mostra mais eficiente quando há altas tensões de  $O_2$  no meio. A vitamina C, ou ascorbato, é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ERMO; porém, pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada, ou quando exposta a metal, levando à lipoperoxidação<sup>16,21</sup>.

Ao lado dos antioxidantes vitamínicos disponíveis em medicamentos, destacam-se também os derivados tióis, entre eles a N-acetilcisteína e mercaptopropionilglicina (MGP). Tais derivados são antioxidantes sintéticos que contêm o grupo -SH em sua composição. A capacidade antioxidante da N-acetilcisteína foi demonstrada pela melhora da complacência pulmonar, mas não da sobrevida, de pacientes com síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) que receberam a droga endovenosa<sup>34,35</sup>. E pelo aumento da taxa de sobrevivência de retalhos de pele de ratos submetidos à isquemia do pedículo vascular após administração endovenosa de MGP<sup>36</sup>.

**ESTRESSE OXIDATIVO**

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH (fig. 2). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo<sup>15,27,37</sup>. Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH. Em pulmões de ratos submetidos à hiperoxia por 48 horas, esta razão está significativamente aumentada, quando comparada a de grupo controle não exposto<sup>38</sup>.

O excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível às custas da ação de compostos antioxidantes, como a GSH<sup>27</sup>.

Utilizando-se o eritrócito como célula-alvo, descreveremos, a seguir, o fenômeno de estresse oxidativo.

A membrana do glóbulo vermelho contém grande número de grupos -SH, e os agentes oxidantes podem converter estes grupos tióis (R-SH) em componentes dissulfeto (R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana<sup>27</sup>. Neste processo, pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina (Hb) à Meta-Hb, que precipita e forma os corpúsculos de Heinz<sup>39,40</sup>.

O componente lipídico da membrana eritrocitária está também sujeito à agressão oxidativa. Os produtos desta lipoperoxidação podem induzir o estresse oxidativo intracelular<sup>41</sup>.

A associação dos fenômenos lipoperoxidação, formação de corpúsculos de Heinz e oxidação dos grupos -SH poderão promover a lesão da membrana do glóbulo vermelho. Se a eficiência do sistema antioxi-

dante for superada pela magnitude destes fenômenos, ocorrerá o estresse oxidativo, que culminará em hemólise. A fig. 2 esquematiza a relação destes processos, considerando o ferro como o agente agressor oxidante e o eritrócito como célula-alvo. No entanto, é possível generalizar este padrão de agressão e defesa celular antioxidante para grande parte dos tecidos do organismo.

### DOENÇAS ASSOCIADAS À ERMO

Existem evidências de que as ERMO possam estar envolvidas em mais de 50 doenças ou eventos nosológicos. Além das já citadas, as doenças pulmonares associadas às ERMO são: enfisema, displasia broncopulmonar, pneumoconiose, toxicidade por bleomicina, paraquat, butilidroxitolueno, fibras minerais e fumo, asma e SARA<sup>42,43</sup>. Nesta última síndrome, a origem das ERMO parece estar relacionada à ativação neutrofílica pelo complemento<sup>44</sup>. Está bem documentado que, após a chegada dos neutrófilos no interstício pulmonar, a ativação destas células gera radical superóxido, que lesa diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio. Como consequência, ocorre lesão tissular progressiva, pois o neutrófilo ativado também libera enzimas proteolíticas que degradam a elastina do arcabouço pulmonar<sup>45</sup>. A gravidade da SARA secundária à hiperoxia depende do grau e do tempo da exposição ao O<sub>2</sub>. Assim, mamíferos inalando 100% O<sub>2</sub>, com pressão parcial arterial de O<sub>2</sub> em torno de 500mmHg, apresentam lesão pulmonar caracterizada por edema, atelectasia, depósitos de fibrina com formação de membrana hialina exsudação celular, enrijecimento arteriolar e hiperplasia e hipertrofia alveolares. Há fortes indícios de que a formação do edema pulmonar seja resultante da produção exagerada de peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e superóxido pelo neutrófilo<sup>43</sup>.

O envelhecimento também é um evento que pode estar relacionado com as ERMO. A teoria dos radicais de oxigênio, desenvolvida por Harman (1956), propunha que o envelhecimento poderia ser secundário ao estresse oxidativo, que levaria a reações de oxidação lipídica, protéica, e com o DNA, que desencadeariam alterações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético. A pergunta chave atual é se este estresse oxidativo tem um peso tão importante, a ponto de explicar o fenômeno do envelhecimento. Não há até o momento evidências consistentes que respondam esta pergunta<sup>46</sup>. Os estudos dos últimos anos demonstram um comportamento heterogêneo do sistema de defesa antioxidante em relação ao envelhecimento. Ou seja, ao contrário do esperado, não se observa, necessariamente, deficiência do sis-

tema conforme a espécie envelhece<sup>47-52</sup>. Um estudo clínico realizado por nosso grupo comparou jovens de 30 anos e idosos de 69 anos em média, ambos saudáveis. Os resultados mostram que os idosos apresentam níveis menores de GSH e diminuição da atividade de GSH-Rd e GSH-Px eritrocitários em relação aos jovens. No mesmo estudo, foi analisado outro grupo de idosos portadores de diabetes melito tipo II tratados com sulfoniluréia, medicamento oral composto por grupos -SH em sua estrutura. Este grupo apresentou maior nível GSH e maior atividade de GSH-Rd e GSH-Px, em relação ao grupo de idosos saudáveis. Estas observações sugerem que a doença ou o tratamento podem estimular o sistema antioxidante eritrocitário em idosos<sup>26</sup>. Outro estudo que relacionou envelhecimento com o sistema de defesa em eritrócitos mostrou que não há consumo de vitamina A e E com o aumento da idade de indivíduos saudáveis<sup>53</sup>. Entretanto, pode haver diminuição do nível muscular de vitamina E após exercício físico em idosos<sup>54</sup>. Outras doenças frequentes na velhice e já consagradas como conseqüentes ao estresse oxidativo são a doença de Parkinson, o acidente vascular cerebral, a doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e catarata. Aqui cabem novas perguntas: o envelhecimento pode ser considerado causa ou conseqüência destas doenças? Ou o envelhecimento poderia ser apenas um evento acompanhante destas doenças?<sup>46</sup>.

A origem da aterosclerose é incerta, porém a teoria corrente é que o início da lesão seja no endotélio por mecanismo hemodinâmico. Nesta lesão há afluxo de macrófagos; quando ativados, liberam radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e enzimas hidrolíticas. Estes produtos, além de lesar células vizinhas, estimulam a proliferação de músculo liso subendotelial. A lesão pode ser exacerbada pela fumaça do cigarro que, por ser rica em ferro, catalisa a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Tal oxidação estimula a internalização de colesterol nos macrófagos, os quais, conseqüentemente, se convertem em células espumosas, contribuindo para a formação da placa de atheroma<sup>1</sup>.

### DETECÇÃO LABORATORIAL DAS LESÕES OXIDATIVAS

A detecção direta das ERMO em sistemas biológicos é dificultada por suas concentrações extremamente baixas (da ordem de 10<sup>-11</sup>M) e por suas altas velocidades de reação, chegando ao ponto de as taxas de produção serem iguais às taxas de reação com biomoléculas<sup>7</sup>. Os subprodutos das ERMO podem ser aferidos diretamente por técnica de ressonância paramagnética de elétrons, porém o custo e outras limitações desta avaliação dificultam seu uso rotineiro.

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

Para finalizar, devemos salientar que as ERMO podem ser causa ou conseqüência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo. Por isso, antioxidantes naturais e sintéticos têm sido recomendados para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e, mesmo, para bloquear sua evolução. No entanto, muito deve ser investigado acerca do benefício dos antioxidantes exógenos. É imperativo determinar o momento exato, a dose, a via de administração e qual o antioxidante ideal para cada doença. Até o momento não existem estudos que respondam com segurança estas indagações. Portanto, a utilização indiscriminada de medicamentos que contenham antioxidantes exógenos deve ser criteriosamente avaliada na terapêutica de doenças associadas ao estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1.609-23.
- Cohen MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Ann Intern Med* 1989; 111: 918-31.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-14.
- Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med* 1991; 118: 7-16.
- Eaton JW. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). *J Lab Clin Med* 1991; 118: 3-4.
- Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 1990; 4: 2.587-97.
- Hatherill JR, Till GO, Ward PA. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents-Actions* 1991; 32: 351-8.
- Dunford HB. Free radicals in iron-containing systems. *Free Radic Biol Med* 1987; 3: 405-21.
- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: some problems and concepts. In Halliwell B (ed): *Oxygen radicals and tissue injury*. Proceedings of a Brook Lodge Symposium; 1987 Apr 27-29; Bethesda (MLD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, 1988; 9-19.
- Aust SD, Miller DM. Role of iron in oxygen radical generation and reactions. In Probst GS, Vodcink MJ, Dorato MA (eds): *New horizons in molecular toxicology: a symposium*. Lilly Research Laboratories Symposium/Molecular Toxicology 1991; May, 29-34.
- van der Kraaij AMM, Mostert LJ, van Eijk HG, Koster JF. Iron-load increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. *Circulation* 1988; 78: 442-9.
- Mello Filho AC, Hoffman ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J* 1983; 218: 273-5.
- Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol* 1989; 26: 277-85.
- Shan X, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther* 1990; 47: 61-71.
- Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 1991; 151-70.
- Gardès-Albert M, Jore D, Ferradini C. Membrane lipid peroxidation: pulse and  $\gamma$ -radiolysis in oxyradical research. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Santa Clara, CRC Press, 1991; 2-30.
- Borg DC, Schaich KM. Iron and iron-derived radicals. In Halliwell B (ed): *Oxygen radicals and tissue injury*. Proceedings of a Brook Lodge Symposium; 1987 Apr 27-29; Bethesda (MLD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, 1988; 20-6.
- Minotti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1987; 262: 1.098-104.
- Horton R, Rice-Evans C, Fuller BJ. The effects of iron-mediated oxidative stress in isolated renal cortical brush border membrane vesicles at normothermic and hypothermic temperatures. *Free Radic Res Commun* 1989; 5: 267-75.
- Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clin Med* 1986; 107: 401-4.
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-60.
- Galleano M, Puntarulo S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271(2-3): 321-6.
- Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989; 257: L163-73.
- van Asbeck BS, Hoidal J, Vercellotti GM *et al*. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. *Science* 1985; 277: 756-9.
- Matsubara LS, Ferreira ALA, Tornero MTT, Machado PEA. Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25: 331-5.
- Gilbert HF, Mc Lean VM. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1990; 63: 69-172.
- Frischer H, Ahmad T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. *J Lab Clin Med* 1987; 109: 583-8.
- Galleano M, Puntarulo S. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 2.349-58.
- Mayes PA. Biologic oxidation. In Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds): *Harper's biochemistry*. San Mateo, Appleton & Lange, 1990; 105-11.
- Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem* 1989; 264: 20.509-12.
- Acharya J, PUNCHARD NA, Taylor JA, Thompson RPH, Pearson TC. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol* 1991; 47: 287-91.

33. Bartosz G, Tannert CH, Fried R, Leyko W. Superoxide dismutase activity decreases during erythrocyte aging. *Experientia* 1978; 34: 1.464.
34. Jepsen S, Herlevsen P, Knudsen P, Bud MI, Klausen NO. Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med* 1992; 20 (7): 918-23.
35. Kollef MH, Shuster DP. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332(1): 27-37.
36. Fontana C, Komatsu CA, Pigozzi E, Gemperli R. The protective effect of mercaptopropionylglycin. A free radical scavenger on ischemia / reperfusion injury in rats. *Rev Soc Bras Cir Plast Est Reconstr* 1994; 9 (2,3): 80-90.
37. Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993; 23(suppl 1): 118-26.
38. Beehler CJ, Simchuk ML, Toth KM *et al*. Blood sulfhydryl level increases during hyperoxia: a marker of oxidant lung injury. *J Appl Physiol* 1989; 67: 1.070-5.
39. Rice-Evans C, Baysal E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. *Biochem J* 1987; 244: 191-6.
40. Winterbourn CC. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol* 1990; 186: 264-72.
41. Rice-Evans C, Baysal E, Flynn D, Kontoghiorghe G. Iron-mediated free radical effects on erythrocytes: the role of desferrioxamine. *Biochem Soc Trans* 1986; 14: 368-9.
42. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991; 91: 2-13.
43. Boveris A, Cadenas E, Reiter R, Chance B, Jamieson D. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 703-19.
44. Thommasen HV. The role of the polymorphonuclear leucocyte in the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Invest Med* 1985; 8:185-94.
45. Crystal RG. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med* 1991; 91: 39S-44S.
46. Nohl H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 653-67.
47. Reiss U, Gershon D. Rat-liver superoxide dismutase: purification and age-related modifications. *Eur J Biochem* 1976; 63: 617-23.
48. Jozwiak Z, Jasnowska B. Changes in oxygen-metabolising enzymes and lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor. *Mech Ageing Dev* 1985; 32: 77-83.
49. Hazelton GA, Lang CA. Glutathione peroxidase and reductase activities in the aging mouse. *Mech Ageing Dev* 1985; 29: 71-81.
50. Farooqui MYH, Day WW, Zamorano DM. Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Comp Biochem Physiol* 1987; 88B: 177-80.
51. Benzi G, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF. Age-related effect induced by oxidative stress on the cerebral glutathione system. *Neurochem Res* 1989; 14(5): 473-81.
52. Lopes-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G. Simultaneous induction of sod, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging. *Free Radc Biol Med* 1993; 15(2): 133-42.
53. Olivieri O, Stanzial AM, Girelli D, Trevisan MT, Guarini P, Terzi M, Caffi S, Fontana F, Casaril M, Ferrari S. Selenium status, fatty acids, vitamins A and E, and aging: the Nove Study. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 510-7.
54. Meydani M. Protective role of dietary vitamin E on oxidative stress in aging. *Age* 1992; 15(3): 89-93.