

Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais

Reactive oxygen species and the respiratory tract diseases of large animals

Andreza Amaral da Silva^I Roberto Calderon Gonçalves^{II}

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

As espécies reativas do oxigênio (ERO) são moléculas instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. As ERO são geradas em grande quantidade durante o estresse oxidativo, condição em que são afetadas moléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácido nucleicos. Neste trabalho, são discutidos os principais conceitos sobre os radicais livres e as ERO: principais tipos, sua formação e a forma como atuam sobre as estruturas celulares, provocando lesão tecidual significativa. Os principais sistemas de defesa antioxidantes e a influência do aumento na produção dessas ERO no trato respiratório de grandes animais também são discutidos, dando ênfase ao envolvimento das ERO em doenças como a pneumonia em ruminantes e na obstrução recorrente das vias aéreas e a hemorragia pulmonar induzida por exercício em equinos.

Palavras-chave: radicais livres, espécies reativas do oxigênio (ERO), trato respiratório, grandes animais.

ABSTRACT

The reactive oxygen species (ROS) are unstable and highly reactive molecules capable of transforming other molecules with which they collide. The ROS are generated in large numbers during the oxidative stress, a condition in which molecules are affected such as proteins, carbohydrates, lipids and nucleic acid. This research discussed the main concepts of the free radicals and ROS: main types, their training and how they act on the cellular structures causing significant tissue injury. The main antioxidant defense systems and the influence of the increase in the production of ROS in the

respiratory tract of large animals are also discussed, with emphasis on the involvement of ROS in diseases such as pneumonia in ruminants and recurrent obstruction of the airways and pulmonary hemorrhage induced by exercise in horses.

Key words: free radicals, reactive oxygen species (ROS), respiratory tract, farm animals.

INTRODUÇÃO

O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR & ERZURUM, 2002). Uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzido, produzindo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas, denominadas espécies reativas do oxigênio (ERO) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO et al., 2002). As ERO podem provocar injúria tecidual (KINNULA et al., 1995) e, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALKO et al., 2007).

O impacto do aumento na produção das ERO, no interior do trato respiratório, pode ser particularmente importante (KINNULA et al., 1995). Em razão da grande área de superfície e do suprimento sanguíneo, o pulmão é o único órgão em toda a

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: andrezaamedvet@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

arquitetura animal que está constantemente exposto a altas tensões de oxigênio. Além disso, as células do epitélio respiratório são as primeiras a entrar em contato com agentes oxidantes inalados durante a respiração, o que torna o trato respiratório ainda mais vulnerável aos danos oxidativos provocados pelas ERO (WRIGHT et al., 1994; RAHMAN et al., 2006).

No entanto, o aparelho respiratório não é afetado passivamente pelo ataque das ERO. Pelo contrário, as células e o fluido que recobrem as vias aéreas contam com um complexo mecanismo de defesa para combater a ação desses oxidantes (WRIGHT et al., 1994). Os vários tipos celulares do trato respiratório diferem profundamente na sua resistência às ERO, o que pode ser parcialmente explicado pelas diferenças entre os mecanismos de defesa e/ou pelo balanço entre oxidantes e antioxidantes nesses microambientes (KINNULA et al., 1995).

Existem evidências de que as ERO podem estar direta ou indiretamente associadas a doenças como enfisema, pneumonia, obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) e hemorragia pulmonar induzida por exercício (HPIE) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; KIRSCHVINK & LEUKEUX, 2005). No entanto, pesquisas na área veterinária acerca do envolvimento das ERO em afecções do trato respiratório são escassas e restritas principalmente à espécie equina (DEATON et al., 2004).

Nesta revisão, serão apresentados os principais conceitos envolvendo radicais livres e ERO, o seu papel na regulação das funções biológicas, nos danos causados às estruturas celulares, bem como na patogênese de doenças do trato respiratório de animais de grande porte. Também engloba as várias vias antioxidantes que protegem o aparelho respiratório contra os efeitos deletérios dos radicais livres.

Espécies reativas do oxigênio: origem e principais fontes

A principal via de metabolismo do oxigênio no organismo envolve a sua completa redução em água, incorporando quatro elétrons ao final da cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria. Se houver, ao longo da cadeia respiratória, redução do oxigênio com número menor de elétrons, haverá produção de ERO, como o superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio ($O_2 + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) e a hidroxila ($H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{\bullet}$) (DAMASCENO et al., 2002; ANDRADE JUNIOR et al., 2005). Entre todos os radicais livres gerados em organismos vivos, as ERO representam a classe mais importante (VALKO et al., 2007). Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos provenientes do oxigênio, pois alguns deles não apresentam elétrons despareados em sua última camada (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O radical $O_2^{\bullet-}$ é formado a partir da redução do O_2 com um elétron (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Em condições fisiológicas, é gerado principalmente nas mitocôndrias, microssomas e peroxissomas (COMHAIR & ERZURUM, 2002). Ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima dos neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). É instável, com vida média de milissegundos e, em razão disso, dificilmente atravessa membranas (COMHAIR & ERZURUM, 2002; DAMASCENO et al., 2002). Entretanto, apresenta meia-vida mais longa do que o OH^{\bullet} , sendo capaz de reagir com as moléculas por mais tempo. É instável em meio aquoso e pode sofrer dismutação espontânea ou enzimática para produzir peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (OLSZEWER, 1995; ANDRADE JUNIOR et al., 2005).

É um agente oxidante fraco, incapaz de causar peroxidação lipídica (OLSZEWER, 1995). No entanto, o $O_2^{\bullet-}$ pode reduzir o ferro iônico e seus complexos proteicos, podendo causar danos aos aminoácidos ou então causar perda da função proteica (COMHAIR & ERZURUM, 2002). Apesar disso, a sua maior toxicidade está na capacidade de produzir outros radicais livres mais citotóxicos e reativos que ele próprio (OLSZEWER, 1995).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

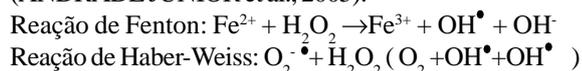
A redução de dois elétrons de oxigênio ou a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ determina a formação do H_2O_2 . Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons despareados na última camada, o H_2O_2 é uma ERO extremamente deletéria, pois participa de reações que produzem o OH^{\bullet} , como, por exemplo, a reação de Fenton (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; COMHAIR & ERZURUM, 2002). O H_2O_2 possui meia-vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas e reagir com metais de transição e algumas hemoproteínas. Pode ainda induzir alterações cromossômicas, romper a coluna do ácido desoxirribonucléico (DNA) e, na ausência de catalisadores, oxidar compostos sulfidril (-SH) (OLSZEWER, 1995).

Radical hidroxila (OH^{\bullet})

É o radical mais reativo que se conhece nos sistemas biológicos. Possui meia-vida muito curta, de aproximadamente 10^{-9} s. Assim, quando produzido in vivo, o OH^{\bullet} causa danos em região próxima ao local onde foi sintetizado. O OH^{\bullet} reage amplamente com aminoácidos, DNA e ácido ribonucleico (RNA). Além disso, também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos

poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (ANDRADE JUNIOR et al., 2005; VALKO et al., 2007).

O OH^\bullet é formado pela fissão homóloga da ligação O-O da molécula de H_2O_2 , pela reação do H_2O_2 com o íon ferroso (Fe^{2+}), conhecida como reação de Fenton, ou pela interação do H_2O_2 com o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), pela reação de Haber-Weiss (ANDRADE JUNIOR et al., 2005):



Embora a cadeia de transporte de elétrons seja o principal sítio de produção de ERO, outras diferentes fontes podem produzir esses oxidantes, como, por exemplo: 1) células fagocíticas durante a explosão respiratória (WRIGHT et al., 1994); 2) peroxissomas por meio da metabolização de ácidos graxos via β -oxidação (WRIGHT et al., 1994); 3) degradação da hipoxantina em xantina pela ação da xantina-oxidase (WRIGHT et al., 1994; ANDRADE JUNIOR et al., 2005); e 4) ação de enzimas do sistema Citocromo P450 (WRIGHT et al., 1994). Outras fontes de ERO incluem, ainda, agentes oxidantes exógenos inalados durante a respiração, como o ozônio (O_3), o dióxido de nitrogênio (NO_2), o monóxido de carbono, a fumaça de cigarro e algumas drogas e bactérias catalase negativas (WRIGHT et al., 1994).

Sistema de defesa antioxidante do trato respiratório

A constante exposição dos tecidos, sobretudo os do trato respiratório, gera radicais livres das mais variadas fontes, levando o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa antioxidante (RAHMAN et al., 2006). No trato respiratório, geralmente as defesas antioxidantes estão no interior das células que o compõem, embora esses antioxidantes sejam pouco eficientes contra a ativação das ERO na superfície das células epiteliais que revestem o aparelho respiratório (MILLS & HIGGINS, 1997).

De modo geral, os agentes antioxidantes podem ser enzimáticos e não enzimáticos. Em relação ao aparelho respiratório, os antioxidantes enzimáticos de maior importância são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as enzimas do ciclo redutor da glutatona, glutatona peroxidase (GSHPx) e glutatona redutase (GR). Entre os antioxidantes não enzimáticos, encontram-se as vitaminas E e C, o selênio, o β -caroteno, algumas proteínas quelantes de metais de transição (Fe e Cu) e a glutatona reduzida (GSH) (ANDRADE JUNIOR et al., 2005).

Superóxido dismutase (SOD)

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas que tem a função de proteger as células aeróbicas contra a ação do $\text{O}_2^{\bullet-}$. Em meio aquoso, ela catalisa a reação de dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 com extrema rapidez, aproximadamente 10 milhões de vezes mais rápida que a dismutação espontânea não enzimática ($\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ - \text{SOD} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). Nos mamíferos, três tipos distintos de SOD são conhecidos: a cobre-zinco SOD (CuZnSOD), a manganês SOD (MnSOD) e a SOD extracelular (ECSOD) (KINNULA & CAPRO, 2003; ANDRADE JUNIOR et al., 2005; RAHMAN et al., 2006).

A CuZnSOD está presente principalmente no citoplasma e em algumas organelas denominadas peroxissomas (BOWIER & CAPRO, 2002; KINNULA & CAPRO, 2003). No aparelho respiratório, é encontrada no epitélio dos brônquios e dos alvéolos, nos fibroblastos, nos macrófagos alveolares, nas arteríolas e nas células do endotélio capilar dos pulmões (KINNULA & CAPRO, 2003; RAHMAN et al., 2006).

A MnSOD é a forma mitocondrial dessa dismutase. É sintetizada inicialmente no citoplasma e transportada para o interior da matriz mitocondrial. Contém manganês em seu sítio ativo e reduz o superóxido gerado durante a cadeia de transporte de elétrons (BOWIER & CAPRO, 2002). A quantidade de MnSOD no interior celular varia de acordo com a quantidade de mitocôndrias encontradas em cada um dos tipos celulares. De maneira geral, se encontram em alta quantidade em células com grande capacidade metabólica, tais como pneumócitos tipo II e macrófagos alveolares, mas também está presente nas células do epitélio das vias aéreas e arteríolas adjacentes ao trato respiratório.

A ECSOD também possui cobre e zinco em sua estrutura e é a principal SOD extracelular. É sintetizada no interior das células e secretada para o meio extracelular. No aparelho respiratório, é produzida por macrófagos alveolares, neutrófilos, células do epitélio bronquial e do endotélio vascular e pneumócitos tipo II (KINNULA & CAPRO, 2003; RAHMAN et al., 2006).

Catalase (CAT)

A Catalase é uma metaloproteína que catalisa a decomposição do H_2O_2 , formado pela ação da SOD, em H_2O e O_2 ($2 \text{H}_2\text{O}_2 - \text{CAT} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) (DAMASCENO et al., 2002; ANDRADE JUNIOR et al., 2005; RAHMAN et al., 2006). Tem afinidade apenas por moléculas de baixo peso molecular, tais como o H_2O_2 , não metabolizando moléculas grandes como os peróxidos lipídicos, produtos da peroxidação lipídica

(COMHAIR & ERZURUM, 2002). Atua de forma complementar ao sistema antioxidante das glutatonas, sendo mais eficiente que este em altas concentrações de H_2O_2 . É encontrada predominantemente no interior das células nos peroxissomos, mas pode também ser encontrada livre no citoplasma e nos fagolisossomos. Em relação ao sistema respiratório, a catalase se concentra no trato respiratório inferior, no interior de macrófagos alveolares, pneumócitos tipo II e células Clara (KINNULA, 2005; RAHMAN et al., 2006).

Ciclo redutor da glutatona

As enzimas que participam do ciclo incluem a glutatona peroxidase (GSHPx) e a glutatona redutase (GR). O ciclo redutor da glutatona é o principal mecanismo de remoção de hidroperóxidos, lipoperóxidos e, assim como a catalase, do H_2O_2 . A GSHPx é uma enzima que contém selênio em seu sítio ativo e é responsável pela redução dos peróxidos, utilizando glutatona reduzida (GSH) como substrato doador de elétron, transformando-a em glutatona oxidada (GSSG) ($H_2O_2 + 2 GSH - GSHPx \rightarrow 2 H_2O + GSSG$). Uma vez oxidada, a GSSG é convertida em GSH pela GR ($GSSG + 2 H - GR \rightarrow 2 GSH$) (DAMASCENO et al., 2002; KINNULA, 2005).

A GSHPx e a GR estão presentes no citoplasma e nas mitocôndrias das células do epitélio das vias aéreas, dos macrófagos alveolares e de outras células pulmonares (RAHMAN et al., 2006).

Antioxidantes não enzimáticos

O α - tocoferol, também denominado vitamina E, é um antioxidante lipofílico e por isso encontra-se presente no interior das membranas celulares. Estruturas com cadeias fosfolipídicas, como a mitocôndria, o retículo endoplasmático e a membrana citoplasmática, possuem vitamina E associada a sua estrutura. Tem propriedades citoprotetoras, pois fornece átomos de hidrogênio do seu grupo hidroxila ao radical lipídico, impedindo a propagação da peroxidação lipídica. Durante a reação, a vitamina E torna-se um radical livre chamado tocoferila, menos reativo que o radical lipídico, que migra para a superfície da membrana para ser novamente transformado em tocoferol, por ação do ácido ascórbico. Entretanto, em altas concentrações, o radical tocoferila pode atuar como pró-oxidante (COMHAIR & ERZURUM, 2002; DAMASCENO et al., 2002).

A vitamina C, por sua vez, é um antioxidante hidrossolúvel, o que permite sua ampla difusão pelos meios intra e extracelular. Seu potencial antioxidante está relacionado à remoção direta de $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} mediante a formação de um radical denominado

semidehidroascorbato. Além disso, contribui para a regeneração da vitamina E oxidada. Entretanto, a vitamina C também possui atividade pró-oxidante. Ela talvez seja o único composto, além do OH^{\cdot} , capaz de converter o Fe^{3+} em Fe^{2+} , o qual reage então com o H_2O_2 para formar OH^{\cdot} (HEFFNER & REPINE, 1989; COMHAIR & ERZURUM, 2002; SOFFLER, 2007).

O selênio (Se) é um micronutriente essencial presente em quantidades variáveis, em quase todos os alimentos da dieta animal (ANDRIGUETTO et al., 2002). Esse elemento atua associado às selenoproteínas, muitas das quais são enzimas antioxidantes que protegem o organismo contra a ação das ERO. A principal delas é a GSH-Px, que possui atividade enzimática relacionada com os níveis de Se nos tecidos em ovinos, bovinos e outros ruminantes (ROWNTREE et al., 2004). A deficiência desse elemento leva à diminuição da atividade de GSH-Px e tem sido associada a severas alterações no metabolismo celular (ROVER JUNIOR et al., 2001). O Se atua sobre a integridade das membranas e na proteção contra degeneração oxidativa dos tecidos

Beta-caroteno é um precursor hidrofílico da vitamina A e se acumula em grandes concentrações nas membranas de certos tecidos. Sua atividade antioxidante está relacionada à remoção de $O_2^{\cdot-}$ e de radicais livres formados durante a peroxidação lipídica (HEFFNER & REPINE, 1989; DAMASCENO et al., 2002).

Outras substâncias, tais como a ceruloplasmina, lactoferrina, ferritina, transferrina e albumina, exercem sua atividade antioxidante, de forma sinérgica ou separadamente, ao inviabilizar a participação dos metais de transição em reações que resultem na formação de radicais livres. Geralmente, esses compostos ligam-se diretamente a esses metais ou então os oxidam, aumentando assim a sua afinidade por outras moléculas (HEFFNER & REPINE, 1989; WRIGHT et al., 1994; MILLS & HIGGINS, 1997).

A GSH está presente no citosol, na mitocôndria e no núcleo da maioria das células do trato respiratório. Exerce funções essenciais à célula, destacando-se sua ação como cofator no ciclo redutor das glutatonas, por meio da doação de átomos de hidrogênio durante a redução de peróxidos pela GSHPx, transformando-se em glutatona oxidada (GSSG) (COMHAIR & ERZURUM, 2002).

Para combater as ERO formadas no espaço extracelular ou de origem exógena, o trato respiratório conta também com defesas antioxidantes presentes no fluido que recobre a superfície de seu epitélio. Os antioxidantes extracelulares presentes nesse fluido incluem a catalase, SOD, GSHPx, GSH, proteínas tais como albumina, ceruloplasmina e transferrina e vitamina

C (BUHL et al., 1996). A origem dos antioxidantes no fluído que recobre o epitélio do trato respiratório ainda permanece incerta. É provável que eles sejam secretados dentro das células epiteliais e sejam transportados para o meio extracelular. As glicoproteínas do muco também possuem capacidade antioxidante e podem reagir com o H_2O_2 e o radical OH^\bullet em um processo em que a glicoproteína e o radical são degradados (WRIGHT et al., 1994).

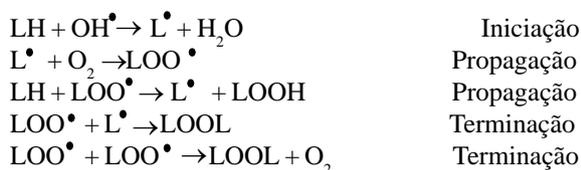
Danos celulares causados pelas ERO no trato respiratório

Sob condições normais, o balanço entre os antioxidantes e as ERO é suficiente para garantir o bom funcionamento de diversos órgãos, entre eles o pulmão. Entretanto, um acréscimo nos agentes oxidantes ou um decréscimo no sistema antioxidante pode destruir esse equilíbrio. Esse estado de desequilíbrio é conhecido como estresse oxidativo, condição em que são afetadas moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, e que está associado a diversas enfermidades das vias aéreas (WRIGHT et al., 1994; KIRSCHIVINK & LEUKEUX, 2005; VALKO et al., 2007).

A oxidação de proteínas funcionais e/ou estruturais e também de polissacarídeos pelas ERO pode provocar mudanças físicas nesses compostos, o que conseqüentemente levará a uma série de alterações nas funções celulares. O transporte de substâncias nas membranas plasmáticas e intracelulares, o controle de vias metabólicas e o reconhecimento de substâncias nos receptores de membrana podem ficar comprometidos (WRIGHT et al., 1994). Além disso, as ERO podem danificar o DNA, causando quebra e modificações nas bases purínicas e pirimídicas e também nos açúcares desoxirribose, levando a alterações na expressão gênica, mutação e apoptose celular (ANDRADE JUNIOR et al., 2005; VALKO et al., 2007).

Entretanto, de todas as ações deletérias associadas ao aumento da formação de ERO e estresse oxidativo, a oxidação das membranas celulares, processo conhecido como peroxidação lipídica, talvez seja a que tenha maior impacto. A lipoperoxidação envolve o ataque das ERO aos ácidos graxos insaturados das membranas, ocorre em cadeia e dá-se em três etapas: 1) iniciação: ocorre o sequestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) pela OH^\bullet na membrana, com conseqüente formação de um radical lipídico (L^\bullet); 2) propagação: o radical lipídico reage rapidamente com um O_2 , resultando em radical peroxila (LOO^\bullet), que, por sua vez, sequestra um novo hidrogênio do ácido graxo insaturado, formando novamente o L^\bullet ;

3) término: ocorre quando os radicais livres (L^\bullet e LOO^\bullet) produzidos se combinam e formam um composto estável ou existe a ação de antioxidantes sobre eles (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; MILLS & HIGGNS, 1997; ANDRADE JUNIOR et al., 2005).



A peroxidação lipídica leva à perda da seletividade na troca iônica e à liberação do conteúdo de organelas (enzimas lisossômicas), além da formação de produtos citotóxicos, determinando a morte celular (DAMASCENO et al., 2002).

Com relação ao trato respiratório, as mudanças provocadas pelas ERO podem resultar em destruição direta de células, particularmente pneumócitos tipo I e células endoteliais. A destruição do tecido elástico pulmonar pelas ERO atenua a complacência pulmonar e, conseqüentemente, diminui sua capacidade de expansão durante a respiração. As ERO são capazes de alterar o tônus da musculatura lisa das vias aéreas, pela criação de um desbalanço entre receptores muscarínicos (contração) e β -adrenérgicos (relaxamento). Elas podem alterar ou interferir em algumas vias metabólicas, como, por exemplo, a cascata da inflamação, onde atuam como mediadores químicos e ativadores de leucócitos, potencializando a resposta inflamatória (MILLS & HIGGNS, 1997). As ERO também desativam as antiproteases endógenas, necessárias para limitar os danos causados pelas proteases liberadas durante o processo de fagocitose (LANSING et al., 1991; MILLS & HIGGNS, 1997). Um aumento na formação das ERO pode levar até mesmo a danos na microcirculação regional e, conseqüentemente, derrame de fluído rico em proteínas no interior dos alvéolos. Esse derrame e a atividade ERO degradam o surfactante, levando a um colapso dos alvéolos e, conseqüentemente, a aumento da resistência pulmonar (MILLS & HIGGNS, 1997). O estresse oxidativo aumenta ainda a secreção de mucina pelo epitélio respiratório, o que diminui a eficiência do batimento ciliar, deixando as vias aéreas susceptíveis a infecções (WRIGHT et al., 1994).

Doenças pulmonares e o estresse oxidativo

Há vários anos o estresse oxidativo é relacionado às doenças das vias aéreas em humanos. Muitas pesquisas já foram desenvolvidas e existem evidências claras do envolvimento direto e indireto das

ERO em doenças como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, síndrome do desconforto respiratório agudo, tabagismo, enfisema pulmonar, entre outras. No entanto, pesquisas que relacionem o estresse oxidativo a afecções do trato respiratório em grandes animais são recentes e limitadas principalmente à espécie equina (ART et al., 1999). Atualmente, a maioria das pesquisas que abrangem o assunto concentram-se nos efeitos da exposição de agentes oxidantes ao trato respiratório (MILLS et al., 1996), na terapia antioxidante para doenças das vias aéreas (KIRSCHVINK et al., 2002a; DEATON et al., 2004) e no exercício (ART et al., 1999; KIRSCHVINK et al., 2002b). Entre as doenças mais estudadas, encontra-se a pneumonia em ruminantes (LEDWOZYW & STOLARCZYK, 1992) e obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) (ART et al., 1999; KIRSCHVINK et al., 2002a; KIRSCHVINK et al., 2002b; DEATON et al., 2004) e hemorragia pulmonar induzida por exercício (HPIE) (MILLS & HIGGINS, 1997) em equinos.

Pneumonia

Existem poucos estudos que relacionam o papel do estresse oxidativo na pneumonia em ruminantes. Nas infecções do trato respiratório, os neutrófilos são recrutados até os pulmões, para auxiliar na remoção de microorganismos por meio de sua atividade fagocítica. Entretanto, em alguns casos de pneumonia, essa atividade fagocítica pode se tornar exagerada e resultar na degradação excessiva de tecido pulmonar. Entre as várias substâncias secretadas pelos neutrófilos, estão as ERO (LYKKESFELDT & SVENDSEN, 2007). LEDWOZYW e STOLARCZYK (1992) observaram que os granulócitos de bezerros portadores de broncopneumonia produzem 10 vezes mais O_2^{\bullet} e possuem menor concentração de SOD no plasma em comparação com animais saudáveis. AL-QUDAH (2009), por sua vez, ao investigar o status oxidativo de bezerros portadores de broncopneumonia aguda e crônica, observou que marcadores de estresse oxidativo, como as Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e os Peróxidos Lipídicos (LPO), encontravam-se elevados nos animais enfermos, principalmente naqueles com doença crônica.

Obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA)

A ORVA é inflamação crônica do complexo brônquico acompanhada por limitação do fluxo aéreo em equinos. O processo inflamatório se caracteriza por uma complexa sequência de eventos, e cada uma delas pode ter consequências deletérias aos pulmões e a seus sistemas de defesa. Durante a inflamação no trato respiratório, ocorre maior expressão de genes

inflamatórios e consequente codificação de agentes pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, fatores de adesão e enzimas inflamatórias (KIRSCHVINK et al., 2002b; DEATON, 2006). Entre os estímulos que contribuem para o aumento da expressão de genes inflamatórios, as reações de formação de ERO encontram-se em lugar de destaque. Alternativamente, durante a inflamação, as ERO podem ser produzidas por células do próprio aparelho respiratório (células epiteliais e macrófagos) e células migratórias (neutrófilos). Como resultado final dessa série de eventos, o processo inflamatório das vias aéreas pode levar a algumas ou todas as mudanças na função pulmonar discutidas anteriormente (WRIGHT et al., 1994).

MILLS et al. (1996) correlacionaram a gravidade do processo inflamatório nas vias aéreas inferiores com a taxa de redução da GSH no lavado broncoalveolar (BAL), sendo esta a primeira indicação de que equinos com vias aéreas inflamadas sofrem estresse oxidativo. Anos mais tarde, ART et al. (1999) mostraram que o estresse oxidativo está presente em animais com ORVA, quando compararam a concentração de GSH e GSSG no BAL de equinos saudáveis e portadores da doença. Ao final do estudo, eles observaram aumento na concentração de GSH e na Taxa de Redução da Glutathiona ($GRR = GSSG / [GSSG + GSH]$) no BAL de equinos com ORVA, sugerindo que houve aumento da defesa antioxidante e também alto grau de oxidação da GSH nesses animais.

Outras pesquisas desenvolvidas recentemente avaliaram equinos saudáveis e portadores de ORVA, sendo os doentes analisados durante a crise e a fase de convalescença. Em um primeiro trabalho, os autores observaram que os episódios de crise da doença estavam associados ao aumento da GSH e da GRR e à porcentagem de polimorfonucleares presentes no BAL (KIRSCHVINK et al., 2002b). Ainda no mesmo estudo, correlações significativas entre variáveis da função pulmonar (mecânica ventilatória e gasometria arterial) e marcadores de estresse oxidativo foram observadas ao serem comparados equinos saudáveis com portadores de ORVA, sugerindo que o estresse oxidativo nos pulmões tem impacto sob a função pulmonar (KIRSCHVINK et al., 2002b). Em outro estudo, equinos em condições clínicas semelhantes aos do trabalho anterior foram submetidos ao exercício físico com aumento gradual de intensidade. Os resultados revelaram que o *status* oxidativo no sangue dos animais enfermos é mais condicionado à doença do que ao exercício (KIRSCHVINK et al., 2002c).

A utilização de antioxidantes em animais portadores de doenças respiratórias há muito desperta

interesse da comunidade científica. Estudos envolvendo a suplementação oral com vitamina E, vitamina C, selênio e flavonóides naturais têm sido realizados em equinos portadores de ORVA (DEATON et al., 2004; KIRSCHVINK et al., 2002a; KIRSCHVINK et al., 2008). Em uma dessas pesquisas, avaliou-se o efeito de um “coquetel” de antioxidantes naturais na inflamação das vias aéreas e no *status* oxidativo do BAL e do sangue de equinos portadores de ORVA. O estudo demonstrou que o *status* oxidativo sistêmico tendeu à melhora, e a gravidade da inflamação diminuiu após o tratamento com antioxidantes (KIRSCHVINK et al., 2002a), provavelmente em razão da diminuição dos estímulos inflamatórios liberados por mediação das EROs. Apesar de os resultados iniciais serem promissores e indicarem que o uso desses compostos pode ser útil no tratamento de doenças respiratórias inflamatórias, ainda é preciso expandir conhecimentos sobre o assunto antes que a sua utilização seja disseminada, uma vez que os reais benefícios clínicos dessa terapia permanecem desconhecidos (DEATON, 2006; SOFFLER, 2007).

Estudos semelhantes foram realizados comparando a concentração de H_2O_2 no condensado do exalado pulmonar de equinos sadios e portadores de ORVA. DEATON et al. (2004) demonstraram que animais doentes apresentam aumento significativo nos níveis de H_2O_2 , no condensado de exalado pulmonar, e que a sua concentração foi inversamente correlacionada à concentração de ácido ascórbico presente no fluido que recobre o epitélio das vias aéreas. Em contrapartida, DUZ et al. (2009) não observaram diferença significativa na concentração de H_2O_2 presente no condensado do exalado pulmonar de equinos sadios e portadores de ORVA. Apesar dos resultados contraditórios, os autores sustentam que é difícil uma comparação direta entre os dois estudos e atribuem diferenças nas metodologias utilizadas para a determinação do H_2O_2 presente no condensado do exalado pulmonar, em cada um dos estudos.

Há muitos anos o modelo de exposição ao ozônio tem sido amplamente utilizado em pesquisa, tanto na medicina humana, como na veterinária, como indutor de estresse oxidativo no trato respiratório (DEATON, 2006; KIRSCHVINK et al., 2008). Entretanto, estudos recentes mostraram que equinos portadores de ORVA não parecem ser mais sensíveis ao ozônio inalado do que os animais controle, apesar de uma leve diminuição não significativa na capacidade antioxidante pulmonar. Isso sugere que a sensibilidade ao ozônio parece ser independente do *status* antioxidante pulmonar inicial (DEATON et al., 2005).

Hemorragia pulmonar induzida por exercício (HPIE)

A HPIE ocorre geralmente em cavalos submetidos a exercícios extenuantes. Enquanto que a clínica da doença já é bem conhecida, a patogênese permanece ainda incerta, embora já se saiba que ela resulta de uma combinação de alta pressão no interior dos vasos pulmonares e uma relativa fragilidade capilar (WEST & MATHIEU-COSTELLO 1995).

Com base em seus estudos, MILLS & HIGGINS (1997) sugeriram que o estresse oxidativo e o Óxido Nítrico (NO) contribuem para a severidade da HPIE. Segundo esses autores, as ERO, ao reagirem diretamente com as estruturas pulmonares, incluindo o endotélio, provocam danos à estrutura pulmonar, resultando em colapso dos alvéolos seguido do aumento da resistência pulmonar, bem como enfraquecimento dos vasos pulmonares. As ERO podem ainda promover a liberação de vasoconstritores, o que aumenta ainda mais a resistência pulmonar. Em associação com o exercício, a elevação da resistência pulmonar resulta no aumento da pressão no interior dos vasos pulmonares que, já fragilizados pela ação das ERO, rompem-se facilmente. Adicionalmente, as ERO podem inibir a produção de NO no endotélio, uma vez que o radical O_2^{\bullet} é capaz de desativar o NO e inibir a atividade da NO-sintetase, provocando vasoconstrição, elevando ainda mais a resistência vascular pulmonar e contribuindo para o desenvolvimento de HPIE.

Outro fator de importante impacto sobre a HPIE é a rigidez eritrocitária induzida pelo exercício, determinando o aumento da viscosidade sanguínea, que pode acarretar em elevação da pressão pulmonar (KIRSCHVINK et al., 2008). Segundo estudos recentes, existem correlações significativas entre a elevação de marcadores do estresse oxidativo no sangue e a diminuição da fluidez da membrana eritrocitária (DE MOFFARTS et al., 2006; PORTIER et al., 2007).

É possível ainda que a hemorragia pulmonar por si só contribua com o agravamento da lesão. Como já foi dito anteriormente, o radical OH^{\bullet} pode ser formado em presença de ferro livre. Em razão da grande quantidade de sangue no interior das vias aéreas, é admissível que, nessa situação, ocorra formação desse radical na presença do ferro originado da metabolização do sangue (MILLS & HIGGINS, 1997).

CONCLUSÃO

Em razão da sua ampla área de superfície e do grande aporte sanguíneo local, as vias aéreas encontram-se permanentemente expostas à ação das ERO e por isso necessitam de um complexo e eficiente

sistema de defesa antioxidante. Apesar de seu potencial deletério, as ERO estão envolvidas em funções fisiológicas fundamentais às células e ao próprio organismo (incluindo mecanismos de defesa celular), tornando a vida inviável na sua ausência. Por isso, o equilíbrio entre a formação das ERO e a atividade do sistema antioxidante é fundamental. Pesquisas nesse campo são relevantes e justificáveis, já que pouco se sabe sobre o papel das ERO nas principais enfermidades do trato respiratório de grandes animais, bem como as variações do metabolismo oxidativo entre as espécies animais. Esse conhecimento deve evoluir juntamente com estudos sobre o uso de terapias antioxidantes capazes de neutralizar os efeitos das ERO sobre o trato respiratório, já que estudos anteriores demonstraram resultados promissores para algumas enfermidades. Muitas combinações relevantes de antioxidantes ainda não foram testadas e suas consequências clínicas de intervenções no “status” oxidativo do organismo permanecem desconhecidas. Por fim, para que no futuro essas substâncias possam fazer parte do arsenal terapêutico no combate às principais doenças respiratórias em grandes animais, é importante concentrar esforços principalmente nos efeitos clínicos da terapia antioxidante, e não só nas habituais avaliações bioquímicas.

REFERÊNCIAS

- AL-QUDAH. Oxidative stress stress in calves with acute chronic bronchopneumonia. **Revue de Medicine Veterinaire**, v.160, n.5, p.231-236, 2009.
- ANDRADE JÚNIOR, D.R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, n.1, p.60-68, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v31n1/23457.pdf>>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1590/S1806-37132005000100011.
- ANDRIGUETTO, J.M. et al. **Nutrição animal – Alimentação animal**. 4.ed. São Paulo: Nobel, 2002. 395p.
- ART, T. et al. Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. **Equine Veterinary Journal**, v.31, n.5, p.397-401, 1999.
- BOWIER, R.P.; CAPRO, J.D. Oxidative stress in airways: is the role for extracellular superoxide dismutase? **American Journal of Respiratory and Critical Care**, v.166, p.S38-S43, 2002. Disponível em: <<http://ajrccm.atsjournals.org/cgi/reprint/166/12/S1/S38>>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1164/rccm.2206014.
- BUHL, R. et al. Oxidant-protease interaction in the lung prospects of antioxidant therapy. **Chest**, v.110, 276S-272S, 1996. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/reprint/283/2/L246>>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1378/chest.110.6_Supplement.
- COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.283, p.L246-L255, 2002. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/reprint/283/2/L246>>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1152/ajplung.00491.2001.
- DAMASCENO, D.C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabetes. **Diabetes Clínica**, v.5, n.5, p.355-361, 2002.
- DEATON, C.M. The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. **Redox Report**, v.11, n.2, p.46-52, 2006.
- DEATON, C.M. et al. Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. **Equine Veterinary Journal**, v.37, n.3, p.243-249, 2005.
- DEATON, C.M. et al. Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. **Journal of Nutrition**, v.134, p.2065S-2067S, 2004.
- DE MOFFARTS, B. et al. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n - 3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses, **Veterinary Journal**, v.174, p.113-121, 2006. Disponível em: <<http://bictel.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ULgetd-07232007-164244/unrestricted/EVJ.pdf>>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.06.001.
- DUZ, M. et al. Exhaled breath condensate hydrogen peroxide and pH for the assessment of lower airway inflammation in the horse. **Research in Veterinary Science**, v.87, n.2, p.307-312, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WR4W4S36R1&_user=972052&_coverDate=10/31/2009&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C00049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=0427dee92c990aaec0f6f387870a74e#secx1>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.03.014.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v43n1/2075.pdf>>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1590/S0104-42301997000100014.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: _____. **Free radical in biology an medicine**. New York: Oxford University, 1999. p.189-276.
- HEFFNER, J.E.; REPINE, J.E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. **American Review in Respiratory Disease**, v.140, p. 531-554, 1989.
- KINNULA, V.L. et al. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. **Laboratory Investigation**, v.73, n.1, p.3-19, 1995.
- KINNULA, V.L.; CAPRO, J.C. Superóxide dismutase in the lung and human lung diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care**, v.167, p.1600-1619, 2003. Disponível em: <<http://ajrccm.atsjournals.org/cgi/reprint/167/>>

12/1600>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1164/rccm.200212-1479SO.

KINNULA, V.L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway disease. **Thorax**, v.60, p.693-700, 2005. Disponível em: <http://thorax.bmj.com/content/60/8/693.full.pdf>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1136/thx.2004.037473.

KIRSCHVINK, N. et al. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **Veterinary Journal**, v.177, n.2, p.178-191, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WXN4PRRH12&_user=972052&_coverDate=08/31/2008&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=a17f49fb49951aa0418bf211fc3d85ca#secx1>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.07.033.

KIRSCHVINK, N. et al. Effect of nutritional supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. **Equine Veterinary Journal**, v.34, p.705-712, 2002a.

KIRSCHVINK, N. et al. Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of healthy and heaves-affected horses. **Equine Veterinary Journal**, v.34, p.563-571, 2002b.

KIRSCHVINK, N. et al. Relationship between markers of blood oxidant status and physiologic variables in healthy and heaves-affected horses after exercise. **Equine Veterinary Journal**, sup.34, p.159-164, 2002c.

KIRSCHVINK, N.; LEKEUX, P. Oxidants and airway inflammations. In: WORLD EQUINE AIRWAYS SIMPOSIUM, 3., 2005, Cornell, Nova York. **Proceedings...** Nova York: Cornell University, 2005. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/WEAS/2005/toc.asp>. Acesso em: 3 de jul. 2008.

LANSING, M. et al. Lipid mediators contribute to oxygen radical induced airways response in sheep. **American Review in Respiratory Disease**, v.149, p.1291-1296, 1991.

LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidant stress in farm animals. **Veterinary Journal**, v.173, n.3, p.502-511, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WXN4KNKH1S1&_user=972052&_coverDate=05/31/2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=3d1416dd011a9fd6af9fc9252f9b0465#secx1>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.06.005.

LEDWOZYW, A.; STOLARCZYK, H. The involvement of polymorphonuclear leukocytes in the pathogenesis of bronchopneumonia in calves. VI. Superoxide dismutase and lipoprotein lipase activities. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.40, p.267-277, 1992.

MILLS, P. et al. Effects of ozone and airway inflammation on glutathione status and iron homeostasis in the lungs of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, p.1359-1363, 1996.

MILLS, P.C.; HIGGINS, A.J. Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: implications for the exercising horse. **Veterinary**

Journal, v.135, n.2, p.125-148, 1997. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WXN4FM0JGX4&_user=972052&_coverDate=03/31/1997&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=8e32ff30f5d77654c34e1ea41f92364b>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1016/S1090-0233(97)80034-2.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em medicina**. São Paulo: BYK, 1995. 204p.

PORTIER, K. et al. In vitro effects of oxygen on physico-chemical properties of horse erythrocyte membrane. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.23, p.340-346, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T6D4MNR0K31&_user=972052&_coverDate=05/31/2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=63cb0bc9a6>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1016/j.etap.2006.12.002.

RAHMAN, I. et al. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v.533, n.1-3, p.222-239, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T1J4JCBM1W1&_user=972052&_coverDate=03/08/2006&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=4f260254bcb783704ed52ee8a8739cde#SECX1>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.087.

ROVER JUNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v24n1/4458.pdf>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1590/S0100-40422001000100019.

ROWNTREE, J.E. et al. Effect of Se on selenoprotein activity and thyroid hormone metabolism in beef and dairy cows and calves. **Journal of Animal Science**, v.82, p.2995-3005, 2004.

SOFFLER, C. Oxidative stress. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.23, n.1, p.135-157, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCH4KJTY SJ1&_user=972052&_coverDate=12/31/2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=a3c3ac28253908b72145b5bf45a212b9#secx1>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

WEST, J.B.; MATHIEU-COSTELLO, O. Stress failure of pulmonary capillaries as a limiting factor for maximal exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.70, p.99-108, 1995. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/k3102nq836t81rm4/fulltext.pdf?page=1>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1007/BF00361536.

WRIGHT, D.T. et al. Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. **Environmental Health Perspectives**, v.102, sup.10, p.85-90, 1994.