UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

TOXICIDADE DE OXIGÊNIO EM PORTADORES
DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE
E EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A
ALTOS NÍVEIS DE POLUIÇÃO

MARISA HELENA GENNARI DE MEDEIROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara

SÃO PAULO
1981

Aos meus pais,

Nilo Mourão de Medeiros e Wanda Genari de Medeiros,

pelo amor, trabalho e sentido de liberdade.

Ao Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara,
pela orientação segura e eficiente.

Ao Paulo Victor,

pelo afeto e compreensão

Um agradecimento especial ao

Dr. Paulo E. Marchiori

pela colaboração e participação entusiástica na
discussão e interpretação dos resultados.

AGRADECIMENTOS

- ao Prof. G. Cilento pela colaboração durante a elaboração deste trabalho.
- ao Luiz Henrique (Lique) por ter dividido comigo com amizade e paciência todos os momentos e constante apoio e interesse com que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho.
- ao Iguatemy, Adilson e Edson pelo auxílio na coleta das amostras de sangue.
- à Ana, Dinha, Lilian, Edy, Roberto, Sérgio, Alberto, Wilson, Shimizu e demais amigos, pela doação de sangue e o carinho de todos os dias.
- à Dona Jacyra e à Lydia, pela amizade.
- à Nazira, pelo carinho e pelo trabalho de datilografia.
- à Prefeitura do Município de Cubatão, pelo apoio na coleta das amostras de sangue na região de Vila Parisi.
- à Dra. Maria do Socorro Onofré, médica do Pronto Socorro de Vila Parisi, pela contribuição durante a coleta de sangue.
- aos alunos da Escola de Formação e Aperfeiçoamento de Soldados da Polícia Militar, dirigida pelo Comandante Cel. P.M. Olandim Trielli Pereira, pela doação de amostras de sangue.
- à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo apoio material.

ÍNDICE GERAL

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Ativação de Oxigênio Molecular	01
1.2. Regulação Biológica de Espécies Ativadas	15
1.3. Aspectos Clínicos da Toxicidade por Oxigênio..	24
1.4. A Poluição em Vila Parisi	32
1.5. Porfiria Aguda Intermitente	35
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Abreviações	43
3.2. Enzimas e Reagentes	44
3.3. Aparelhagem	44
3.4. Métodos	45
4. RESULTADOS	
4.1. Grupo Controle	58
4.2. Indivíduos Portadores de IAP	58
4.3. Indivíduos Residentes em Vila Parisi	65
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	
5.1. Metodologia	88
5.2. Níveis de SOD, Catalase e GSH-Px em Eritróci- tos de Indivíduos Portadores de IAP	90
5.3. Atividades Eritrocitárias de SOD, Catalase e GSH-Px de Residentes em Vila Parisi	98
6. SUMÁRIO	106
7. SUMMARY	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ativação de Oxigênio Molecular

1.1.1. Redução Biológica de Oxigênio Molecular

A vida dos organismos aeróbicos depende da manutenção de biomoléculas no estado reduzido, porém numa atmosfera oxidante, e da obtenção de energia via respiração, cuja etapa essencial consiste na redução de O_2 a H_2O :

O oxigênio molecular apresenta um estado fundamental triplete. Por outro lado, seus produtos de redução (H_2O_2 e H_2O) apresentam um estado fundamental singlete. A redução direta de O_2 por dois elétrons é, portanto, proibida pela conservação de spin. Existem alguns modos desta situação ser contornada, ou seja, de o oxigênio molecular ser ativado (Nishinaga, 1977):

- (i) excitação eletrônica a oxigênio singlete, 1O_2 (inversão de spin);
- (ii) coordenação de O_2 a complexos de metais de transição;
e
- (iii) redução de O_2 em etapas de um elétron.

No último caso, os seguintes intermediários seriam produzidos:

ESQUEMA I

Apesar de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ ocorrerem provavelmente em baixas concentrações, eles são metabolitos normais em células aeróbicas.

O par $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{HO}_2^\cdot$ (íon radical superóxido/radical perhidroxil) e H_2O_2 atuam frequentemente como oxidantes nucleofílicos (Michelson e colaboradores, 1977). As propriedades oxidantes e redutoras do par $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{HO}_2^\cdot$ são fartamente demonstradas na literatura (Morooka e colaboradores, 1976). Alguns exemplos são citados abaixo:

(i) Miller e Rapp (1973)

(ii) Bechara e Cilento (1971)

(iii) Ballou e colaboradores (1969)

(iv) Sutton e colaboradores (1976)

Em soluções aquosas, típicas de sistemas biológicos, as propriedades químicas de O_2^- são muito diferentes do que em solventes orgânicos. Em pH fisiológico, a forma protonada $\text{HO}_2^\cdot$, que é agente oxidante mais forte que O_2^- , está presente em pequena concentração, pois seu $\text{pK}_a = 4,8$. Assim, não faria sentido propor-se um papel biológico para o par $\text{O}_2^-/\text{HO}_2^\cdot$.

ESQUEMA II

A hipótese do O_2^- não ser reativo em sistemas biológicos pode ser contestada com a idéia de que, como grande parte do O_2^- gerado nas células é originário de sistemas ligados a membrana, tais como cadeia de transporte de elétrons de cloroplasto, mitocondria e retículo endoplasmático e, sendo o interior de membranas hidrofóbico, as propriedades do íon superóxido nestes sistemas seriam semelhantes àsquelas em solventes não aquosos (Halliwell,

1978, referência citada em Halliwell, 1981). Tais efeitos têm sido atribuídos a espécies reativas derivadas de O_2^- , principalmente radical hidroxil ($HO^\bullet$) e oxigênio singlete (1O_2). Existem algumas evidências de que esta última espécie é produzida através da reação de Haber-Weiss, catalisada por metais:

Estes resultados ainda não foram satisfatoriamente interpretados, uma vez que compostos sequestradores de oxigênio singlete não são tão específicos como proposto originalmente. Sabe-se hoje que o próprio O_2^- sequestra 1O_2 (Guiraud e Foote, 1976; Foote e colaboradores, 1980). Então antes que a ação de oxigênio singlete seja usada como explicação para os danos provocados por O_2^- , deve ficar estabelecido que 1O_2 é realmente produzido pelo sistema do íon O_2^- .

Muitos dos efeitos deletérios do sistema O_2^-/HO_2 são diminuídos por substâncias que sequestram $HO^\bullet$, tais como manitol, formiato e tiouréia (Halliwell, 1981). As enzimas catalase e superóxido dismutase (SOD) também atuam minimizando esses danos, sugerindo o possível envolvimento de espécies H_2O_2 , $HO^\bullet$ e O_2^- , das quais o radical $HO^\bullet$ é o mais deletério por causa da sua alta e indiscriminada reatividade.

Foi sugerido por Fridovich (1975) que O_2^- e H_2O_2 podiam reagir entre si (reação de Haber-Weiss) gerando $HO^\bullet$:

Entretanto, como a constante de velocidade desta reação é muito pequena, ($k < 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Rigo e colaboradores, 1977) sua importância seria reduzida pelas baixas concentrações de $\text{O}_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 presentes in vivo (Halliwell, 1978). Todavia, a reação de Haber-Weiss é termodinamicamente possível e, vários tipos de íons de metais de transição presentes in vivo (principalmente de ferro) poderiam agir como catalisadores. Neste caso pode ser proposta a seguinte sequência de reações (Halliwell, 1981):

ESQUEMA III

Este pode não ser o mecanismo correto, mas fornece uma possível explicação de como SOD e catalase poderiam inibir a formação do radical $\text{HO}^{\cdot}$. A capacidade do sistema de $\text{O}_2^{\cdot -}$ gerar $\text{HO}^{\cdot}$ na presença de íons de ferro tem sido demonstrada pela habilidade de tais radicais degradarem triptofano (McCord e Day, 1978), hidroxilar compostos aromáticos (Halliwell, 1978a) e reagirem com "spin-traps" (Buettner e colaboradores, 1978).

Existe ainda muita controvérsia a respeito da importância biológica da reação de Haber-Weiss catalisada por metais. Para aceitá-la como explicação da toxicidade de sistemas que geram íons $\text{O}_2^{\cdot -}$, deve-se procurar evidências de que a proteção contra a

formação de $\text{HO}^\bullet$ pode ser feita tanto pela remoção de O_2^- como de H_2O_2 . Assim, por exemplo, é bastante significativa a ocorrência de organismos que não têm catalase e peroxidase, mas, apenas atividade de SOD (Fridovich, 1975; Halliwell, 1978b). Existe também o caso do gnococcus, que é uma bactéria aeróbica que pode sobreviver e replicar-se no interior de fagocitos sob um grande fluxo de O_2^- e H_2O_2 e não contém SOD, mas uma atividade extremamente alta de catalase (Norrod e Morse, 1979). Deve-se ressaltar aqui o caso do procarioto mycoplasma pneumoniae que, apesar de consumir oxigênio e gerar O_2^- , não tem atividade detectável de SOD ou catalase, faltando, no entanto, determinar se existem outros caminhos de inativação de espécies ativadas de oxigênio como sua redução por glutatona ou decomposição de H_2O_2 catalisada por NADH peroxidase (Lynch e Cole, 1980). No entanto, a maioria dos organismos aeróbicos tem os dois sistemas de proteção: SOD e enzimas responsáveis pela remoção de H_2O_2 .

1.1.2. Fontes Biológicas de Espécies Ativadas de Oxigênio Molecular

Em fígado de rato, espécies ativadas de oxigênio podem ser produzidas em duas categorias de reações (Oshino e Chance, 1977): (i) redução divalente de O_2 por oxidase e (ii) redução univalente de O_2 a O_2^- em certas reações enzimáticas (Sies, 1974). Discutiremos brevemente a contribuição de cada fração subcelular isolada na produção de espécies ativadas de oxigênio.

1.1.2.1. Mitocôndrias

As membranas mitocondriais foram reconhecidas como possíveis fontes fisiológicas de H_2O_2 quando se demonstrou que partículas submitocondriais obtidas por sonicação ou por tratamento alcalino produzem H_2O_2 (Hinkle e colaboradores, 1967; Jensen, 1966).

Partículas submitocondriais de coração de rato são fontes efetivas de H_2O_2 (Boveris e Cadenas, 1975) e uma vez que são destituídas de dehidrogenases auxiliares, tais como flavoproteínas para oxidação de ácidos graxos, a formação de H_2O_2 pode ser diretamente relacionada com os componentes da cadeia respiratória. Como uma das etapas de oxiredução da cadeia respiratória se processa no segmento succinato dehidrogenase-citocromo b, foi investigado a formação de O_2^- como produto de redução primária de oxigênio neste sítio. Neste caso, as partículas submitocondriais geraram de 4 a 7 nmol O_2^- /min por miligrama de proteína numa relação $O_2^- / H_2O_2 = 1,5$ a $2,1$ (Boveris e Cadenas, 1975; Boveris e colaboradores, 1973; Dionisi e colaboradores, 1975), mostrando que O_2^- é, na verdade, quase um precursor estequiométrico de H_2O_2 mitocondrial. Considerando os níveis de H_2O_2 , as membranas mitocondriais podem produzir cerca de 24 nmol O_2^- / min. por grama de tecido no fígado (Boveris e colaboradores, 1972) e são aparentemente uma das principais fontes fisiológicas de O_2^- .

1.1.2.2. Peroxisomas

Esta organela de fígado e de outros órgãos contém um gran-

de número de enzimas que geram H_2O_2 , incluindo algumas flavoproteínas tais como a D-aminoácido oxidase, a L-hidroxiácido oxidase e a urato oxidase. No caso da reação catalisada pela lactato oxidase, a produção de H_2O_2 está ilustrada pelo esquema abaixo (Flashner e Massey, 1974):

ESQUEMA IV

Lazarow e De Duve (1976) observaram a formação de H_2O_2 dependente de uma palmitoil-CoA desidrogenase em frações peroxissomais isoladas de fígado de rato o que coloca, também, os ácidos graxos na lista de substratos potenciais de produção de H_2O_2 nos peroxissomas.

1.1.2.3. Retículo Endoplasmático

A autoxidação do citocromo P_{450} fornece O_2^- , e diversos trabalhos (Bartoli e colaboradores, 1977; Estabrook e Werringloer, 1977; Mishin e colaboradores, 1976) indicam uma produção de quan-

tidades consideráveis de O_2^- por microsomas isolados. O sistema flavoproteína-NADPH-citocromo c redutase e citocromo P_{450} são as fontes mais prováveis de H_2O_2 e O_2^- nessas membranas (Hildebrant e Roots, 1975)

1.1.2.4. Enzimas do Citosol

Enzimas como xantina-oxidase e aldeído oxidase contribuem para a produção de H_2O_2 . Entretanto, a quantificação desta contribuição no sobrenadante, após fracionamento celular, indicou um valor de apenas cerca de 5% da produção celular de H_2O_2 (Boveris e colaboradores, 1972). Contudo, é muito difícil avaliar esta produção em condições fisiológicas.

1.1.2.5. Produção química e in vitro de espécies ativadas.

A produção química e bioquímica de O_2^- e $HO^\cdot$ é também discutida detalhadamente em trabalhos de Michelson e colaboradores e de Fridovich (1977). São mencionados vários métodos, entre eles:

(i) irradiação de meio aquoso aerado com raios X, raios γ , raios cósmicos e elétrons acelerados:

Na presença de O_2 :

$HO_2^\bullet$ e $O_2^{\bar{\bullet}}$ reagem com outras moléculas e também outras espécies reativas formando, por exemplo:

Niwa e colaboradores (1977) discutiram a proteção promovida por SOD em radioterapia denominada "efeito O_2 ". Oxigênio molecular aumenta a radiosensibilidade de organismos vivos (microbios, plantas e animais), ocasionando alterações no crescimento, mutação e morte. Os seres humanos são radioresistentes devido a altos níveis de SOD (Hartz e colaboradores, 1973).

(ii) oxidação de oxihemoglobina, sob certas condições, a met hemoglobina (Misra e Fridovich, 1972):

(iii) produção de $O_2^{\bar{\bullet}}$ na oxidação de NADPH por O_2 , catalisada por uma enzima ligada a membrana de neutrófilos polimorfonucleares, denominada superóxido sintetase (Goldstein e colaboradores, 1975). Esta enzima atua durante a fagocitose de bactérias e outros materiais estranhos.

Uma vez que espécies ativadas de oxigênio são interconvertíveis através de reações do tipo:

ESQUEMA V

todas as células aeróbicas, procarióticas e eucarióticas, contêm um certo nível dessas espécies, limitado pela velocidade de produção comparada com a velocidade de destruição por desproporcionamento espontâneo catalisado por enzimas e por outros processos.

1.1.3. Toxicidade de espécies ativadas de oxigênio

Apesar do oxigênio ser essencial para a sobrevivência de organismos aeróbicos ele é tóxico quando presente em concentrações superiores a do ar atmosférico. Animais expostos a pressões de oxigênio de cerca de 2 ou 3 atm apresentam sintomas que se iniciam com convulsões generalizadas (Van Den Brenk e Jamieson, 1964) seguidos de sérios danos pulmonares (Wood e Perkins, 1970). A maioria dos tecidos humanos (se não, todos) é sensível a danos por oxigênio.

Como comentamos anteriormente, a ação tóxica de H_2O_2 e O_2^- é devida, aparentemente, a capacidade de tais espécies de oxidar substâncias como adrenalina, ou reduzir citocromo c e outras hemoproteínas e também de iniciar reações radicalares em cadeia levando à peroxidação de lipídeos (Chance e colaboradores, 1979).

Como consequências da peroxidação de lipídeos, temos (i) a perturbação da microestrutura de membranas devido a introdução de funções hidrofílicas, (ii) inibição de atividades enzimáticas dependentes de grupos SH por hidroperóxidos e (iii) reações subsequentes dos produtos de quebra, tais como os aldeídos, e (iv) "fotobioquímica no escuro" (Cilento, 1980).

Foi observado também, que a toxicidade radioativa envolve essencialmente os mesmos intermediários de O_2 que são responsáveis por toxicidade por oxigênio. Observa-se uma proteção significativa de superóxido dismutase em bactérias submetidas à radiação ultravioleta (365 nm).

O íon superóxido é, portanto, responsável por danos efetivos em diversas estruturas biológicas tais como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos e, conseqüentemente, provoca alterações letais quando sua concentração é tão grande que não possa ser controlada pelas enzimas intracelulares.

Tem sido proposto também, por diversos autores, o envolvimento de espécies ativadas de oxigênio em processos de envelhecimento (Harman, 1971). Isto foi baseado no fato de que crescimento celular sob baixa tensão de oxigênio (Packer e Fuehr, 1970) ou na presença de vitamina E (Packer e Smith, 1974) aumentam o tempo de vida em que células humanas diplóides podem se replicar.

Uma vez que espécies ativadas de oxigênio podem ser tóxicas para diferentes componentes e estruturas celulares como moléculas pequenas, macromoléculas, material genético e membranas em geral, deve ser ressaltado aqui a ameaça que estas espécies representariam para a célula, caso sua produção in vivo não fosse controlada.

1.1.4. Outros meios de Ativação de Oxigênio Molecular

Relembramos aqui que a redução de O_2 em etapas de um elétron dando O_2^- , $HO^\cdot$ e H_2O_2 não é o único meio de ativação de oxigênio molecular. Isto também pode se processar, por exemplo, através da excitação eletrônica a oxigênio singlete, que é devida a uma perturbação nos orbitais π^* , sem envolver um processo de transferência de elétrons.

O oxigênio singlete é produzido em vários processos envolvendo reações de fotossensitização, irradiação com microondas e em reações químicas que utilizam H_2O_2 e ozônio (Kearns, 1971).

A seguir, exemplificamos algumas reações típicas de 1O_2 (Foote, 1976):

i) Adição-1,4 em dienos e heterociclos, formando um endoperoxídeo:

ii) Adição-1,3 a olefinas, com produção de hidroperóxido alílico:

iii) Adição-1,2 a certas olefinas de alta densidade eletrônica, como enaminas e éteres vinílicos:

iv) Oxidação de sulfetos à sulfóxidos:

v) Fotooxidação de fenóis:

O oxigênio molecular também pode ser ativado através da co ordenação com complexos de metais de transição (Nishinaga, 1977). A estrutura e estado eletrônico que resultam desta complexação depende da natureza do metal ligante. A reatividade do O_2 coordenado está diretamente relacionado com a natureza desta coorde nação.

1.2. Regulação Biológica de Espécies Ativadas

1.2.1. Catalase, Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px).

Embora presentes em baixas concentrações, os produtos de redução do oxigênio são metabólitos normais em células aeróbicas. A defesa contra essas espécies tóxicas é devida, principalmente, à baixa tensão de oxigênio nos tecidos, a qual é mantida, em primeiro plano, pelo sistema microvascular. As arteríolas são sensíveis a altas pressões de oxigênio, o que leva à diminuição da circulação de sangue no órgão em questão.

A proteção biológica contra efeitos tóxicos associados com níveis excessivos de O_2^- , H_2O_2 e $\text{OH}^\cdot$ tem sido atribuída a três

enzimas principais, presentes em eritrócitos e outras células: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

A catalase é amplamente distribuída em animais, plantas e bactérias (Nicholls e Schombaum, 1963). Está localizada, predominantemente, em organelas subcelulares tais como peroxissomas de fígado e rim e em agregados menores tais como microperoxissomas em uma variedade de outras células. Todas as catalases isoladas até agora têm 4 átomos de ferro por molécula. O ferro está presente na forma de 4 grupos prostéticos Fe^{3+} -protoporfirina IX, exceto nas catalases de fígado onde um ou mais grupos prostéticos estão degradados como pigmentos de bile.

A catalase exibe dois tipos de atividade (catalásica e peroxidásica) com características cinéticas completamente diferentes (Schombaum e Chance, 1976). As três equações abaixo descrevem a cinética da catalase na sua função catalásica (Eq. 1 e 2) e peroxidásica (Eq. 1 e 3):

ESQUEMA VI

$$k_1 = 1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_4' = 2,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_4 = 0,2 - 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

A catalase é bastante específica para peróxidos, uma vez que apresenta atividade apreciável somente para hidrogênio-, metil- e etilhidroperóxidos. No caso dos doadores de hidrogênio (AH_2), incluem-se uma sequência similar de álcoois alifáticos, com alta atividade para metil- e etil derivados e baixa atividade para butil- e homólogos maiores.

A glutathiona peroxidase (GSH-Px), catalisa a reação de hidroperóxidos com glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto de redução de hidroperóxido, segundo a reação abaixo:

Esta enzima apresenta alta atividade no fígado e em eritrócitos e uma baixa atividade nos músculos (Chow e Tappel, 1972). A glutathiona peroxidase é específica para o doador de hidrogênio (GSH) mas não tem especificidade para o hidroperóxido. Com isso, a variação de possíveis substratos se estende desde H_2O_2 até hidroperóxidos orgânicos entre os quais hidroperóxidos lipídicos de várias estruturas.

A glutathiona peroxidase contém um átomo de selênio por subunidade (4 subunidades), e, ao contrário de diversas peroxidases de origem animal (lactoperoxidase, mieloperoxidase, peroxidase de tiróide), não tem grupo prostético derivado de hemina.

Sua distribuição celular em fígado de rato é complementar a da catalase: dois terços da enzima no citosol e um terço na mitocôndria e não existe glutathiona peroxidase nos peroxissomas.

Portanto, o fato da glutathione peroxidase compartilhar o metabolismo da H_2O_2 com a catalase está baseado na forma de compartimentalização das duas enzimas nas células.

A glutathione peroxidase constitui a primeira linha de defesa contra oxidações danosas ao organismo causadas por H_2O_2 ou peróxidos lipídicos produzidos em várias células do corpo (Cohen e Hochstein, 1963). A identificação dos produtos através da redução de peróxidos lipídicos pela glutathione peroxidase sugere que esta enzima bloqueia a reação autocatalítica em cadeia da peroxidação de lipídeos impedindo danos à membrana causados por processos oxidativos (Christophersen, 1969). Altos níveis de hidroperóxidos derivados de aldeídos, ácidos, ésteres e tioésteres poderiam levar à formação de produtos de clivagem C - CO, dando um produto eletronicamente excitado que levariam a processos com a potencialidade de "fotoquímica no escuro" (Cilento, 1980).

A superóxido dismutase, descrita por McCord e Fridovich em 1968, catalisa o desproporcionamento de O_2^- :

Sabe-se hoje que os superóxidos dismutases são metaloproteínas presentes em todas as células aeróbicas (Fridovich, 1972, 1974, 1975). São conhecidas três classes desta enzima, todas com a mesma atividade catalítica, mas diferindo na natureza do metal presente no sítio ativo. A eritrocupreína contém $2 Cu^{2+}$ e $2 Zn^{2+}$ em duas subunidades idênticas e está presente no cito-

plasma de células eucarióticas e também em cloroplastos.

O mecanismo de ação enzimática da eritrocupreína foi proposto por Fridovich (1979) como:

ESQUEMA VII

Na mitocôndria encontra-se maior atividade de uma superóxido dismutase contendo Mn^{2+} (2 Mn^{2+} e 4 subunidades). Algumas bactérias e algas contêm um tipo de superóxido dismutase contendo ferro como componente metálico. Uma diferença importante entre estas enzimas é que cianeto inibe a eritrocupreína e não tem nenhum efeito nas superóxido dismutases contendo ferro e manganês.

Michelson (1977) discutiu recentemente os efeitos de sistemas produtores de O_2^- e de espécies ativas associadas sobre várias macromoléculas, bactérias e células eucarióticas e a proteção promovida pela superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Níveis muito altos de O_2^- devido a baixa concentração de superóxido dismutase poderiam resultar na oxidação de vários neuromediadores (vide Ítem 1.2.15) em danos a membranas e estruturas subcelulares (mitocôndria de fígado, por exemplo, causando problemas hepáticos), em lesões a material genético, etc. Se por outro lado, a superóxido dismutase está presente em con-

centrações acima do normal, várias reações enzimáticas, onde O_2^- é intermediário, seriam bloqueadas, como biossíntese de neurotransmissores e a destruição oxidativa de halucinógenos (por ex. a triptamina) podendo levar a debilidade mental e outras aberrações. Assim, por exemplo, a biossíntese de norepinefrina a partir de tirosina, onde o passo final envolve a hidroxilação de dopamina por uma oxigenase, acoplada com a oxidação de ascorbato (Vanneste e Zuberkuhler, 1974), é mediado por íons superóxido:

Níveis anormais de H_2O_2 e peróxidos orgânicos podem, como já foi visto, exercer ação tóxica iniciando peroxidação de lipídeos, inibindo reações enzimáticas, etc. A principal defesa celular contra níveis anormais destas espécies é exercida pela glutathiona peroxidase e catalase.

1.2.2. Outros Tipos de Regulação

Além do controle exercido pela superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase, são conhecidas outras enzimas que

metabolizam produtos de redução do oxigênio como mostraremos a seguir.

1.2.2.1. Heme peroxidases

As heme peroxidases estão entre as enzimas mais estudadas por causa da sua ampla distribuição e estabilidade química. Yamazaki (1974) e Dunford e Stillman (1976) elaboraram uma revisão detalhada sobre a função e estrutura de peroxidases. Comentaremos brevemente algumas peroxidases de mamíferos.

A lactoperoxidase, presente nas glândulas salivares e mamas utiliza doadores de hidrogênio comuns como pirogalol, guaiaicol e benzidina (Sauders e colaboradores, 1964, referência citada em Chance e colaboradores, 1979). Tem-se sugerido que esta peroxidase age como inibidor do crescimento de bactérias orais uma vez que lactoperoxidase, peróxidos e haletos podem inibir o crescimento aeróbico de alguns microorganismos (Morrison e colaboradores, 1965).

A peroxidase de tiróide, catalisa a oxidação de iodeto a iodo, desempenhando um papel importante na síntese de hormônios tireoidianos. Já a mieloperoxidase, encontrada em neutrófilos, desempenha função fisiológica em células fagocitóticas.

1.2.1.2. Citocromo Oxidase

O citocromo a_3 é a oxidase terminal da principal via de res

piração celular. Diversas evidências da formação de intermediários de redução neste sítio, sugerem que a redução de oxigênio até H_2O se processa em passos de um elétron (Chance e colaboradores, 1979). Entretanto, para prevenir que os produtos de redução do oxigênio causem danos ao meio externo caso sejam liberados, o peróxido fica firmemente ligado ao heme da oxidase até a redução final a H_2O .

1.2.1.3. Citocromo P_{450}

A cadeia de transporte de elétrons do NADPH para citocromo P_{450} , localizada na membrana do retículo endoplasmático, em mitocôndria da córtex adrenal e em outros órgãos, catalisa reações de monooxigenação de substratos endógenos ou substâncias provindas do meio externo como drogas (Orrenius e Ernster, 1974). O mecanismo de ação desta enzima, proposto por Estabrook e colaboradores (1971), está esquematizado na figura abaixo:

1.2.1.4. Indolamina 2,3-dioxigenase

A indolamina 2,3-dioxigenase é uma dioxigenase, contendo grupo heme, que catalisa a clivagem oxidativa de indolaminas substituídas ou não, tais como triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e serotonina (Hirata e Hayaishi, 1972). Recentemente foi demonstrado que esta enzima utiliza O_2^- ao invés de oxigênio molecular como agente oxidante (Hirata e Hayaishi, 1977).

1.2.1.5. Remoção de íons superóxidos por catecolaminas

Um dos primeiros métodos de dosagem de SOD foi baseado na capacidade de epinefrina, uma catecolamina, em remover íons superóxido (McCord e Fridovich, 1969). Nesta reação, a epinefrina é transformada em um produto avermelhado, o adrenocromo.

A SOD intercepta os íons O_2^- , gerados pelo sistema xantina-oxidase, e inibe o aparecimento da cor vermelha. Mais tarde, foi descrito por Misra e Fridovich (1972), um sistema de dosagem desta enzima baseado na autooxidação da epinefrina. Os íons superóxidos

eram gerados durante a reação entre epinefrina e oxigênio molecular. Foi então proposto que $O_2^{\cdot -}$ catalisa a reação propagando espécies radicalares em um mecanismo de reação em cadeia. Estes estudos estabeleceram a ação da epinefrina como um sequestrador de íons superóxidos. Posteriormente, Cohen e Heikkila (1977) discutiram a capacidade de uma outra catecolamina, norepinefrina, de agir como sequestrador de íons superóxidos junto aos terminais dos nervos simpáticos. Além disso, apresentaram evidências a favor da formação de radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) mediada por $O_2^{\cdot -}$ nesses nervos. A geração destes radicais está associada com fenômenos tóxicos, isto é, a destruição de terminais dos nervos simpáticos, e a capacidade da norepinefrina em sequestrar íons superóxidos estaria associada então com a proteção destes terminais de nervos.

1.3. Aspectos Clínicos da Toxicidade por Oxigênio

A ocorrência de espécies ativadas de oxigênio em condições fisiológicas está atualmente bem aceita (Chance e colaboradores, 1979). As enzimas responsáveis pela proteção biológica contra níveis excessivos destas espécies são: SOD, GSH-Px e catalase.

A Figura 1.1 mostra esquematicamente o papel destas enzimas nos diferentes compartimentos subcelulares. Queremos ressaltar a ameaça que $HO_2^{\cdot}$, H_2O_2 , $HO^{\cdot}$ e 1O_2 poderiam representar para a célula, caso sua produção in vivo não fosse controlada.

FIGURA 1.1 - Esquema geral do papel de SOD, Catalase e GSH-Px e suas distribuições subcelulares.

Tais espécies podem, entre outros malefícios, causar alterações no DNA, inativar enzimas e especialmente levar à peroxidação de lipídeos (vide Ítem sobre toxicidade). Diversos pesquisadores tem empenhado um enorme esforço (cerca de 60 trabalhos publicados em 1980/81) em relacionar o possível envolvimento de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $HO^{\cdot}$ em diversos estados patológicos através de dosagens de SOD, catalase e glutathione peroxidase as quais, como vimos, constituem a principal linha de defesa do organismo contra a toxicidade destas espécies. A seguir, discutiremos algumas patologias onde os níveis destas enzimas mostraram-se alterados.

1.3.1. Trisomia 21

Os níveis de superóxido dismutase e de glutathione peroxidase em indivíduos com trisomia 21 é cerca de 1,5 vezes maior que em indivíduos normais (Michelson, 1977), enquanto que os níveis de catalase são completamente normais. Uma vez que o gene da superóxido dismutase está localizado no cromossomo 21, interpretou-se inicialmente a relação 1,5 como refletindo a dosagem do defeito genético. Porém como em diversas outras patologias, foram encontrados níveis altos de SOD, estes resultados não podem ser utilizados como prova dessa correlação.

1.3.2. Distrofia Muscular de Duchenne

A etiologia desta doença tem sido explicada como um defeito genético que afeta a estrutura e permeabilidade de membranas

(Rowland, 1976). Encontrou-se em pacientes portadores desta doença uma diminuição de 19% nos níveis de SOD em eritrócitos. Os níveis de glutathione peroxidase apresentaram-se normais o que mostra que esta enzima provavelmente não está envolvida na etiologia de doença (Burri e colaboradores, 1980).

1.3.3. β -Talassemia

As talassemias são um grupo de anemias hereditárias nas quais a velocidade de síntese de uma das cadeias de hemoglobina é diminuída. As talassemias "major" e "minor" referem-se aos estados homo e heterozigotos, respectivamente. O prefixo α ou β designa qual cadeia de hemoglobina está sendo sintetizada com baixa velocidade.

Uma vez que a autooxidação de cadeias de hemoglobina podem levar a um aumento na produção de superóxido (Brunori e colaboradores, 1975) e consequentemente a um aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio provenientes da dismutação destes radicais pela superóxido dismutase, Gerli e colaboradores (1980) investigaram o nível de SOD, catalase e GSH-Px em eritrócitos de indivíduos com β -talassemia. Foi observado um aumento significativo no nível destas enzimas em indivíduos com β -talassemia "minor" e níveis similares ao normal em portadores de β -talassemia "major" que nunca tinha sofrido transfusão sanguínea.

Pode-se então especular que a alteração nos níveis destas enzimas represente um mecanismo de defesa desenvolvido pelas células

lulas contra um aumento nos níveis de $O_2^{\cdot -}$ devido a autooxidação das cadeias de hemoglobina.

1.3.4. Casos Psiquiátricos

Michelson e colaboradores (1977) examinaram os níveis de SOD e catalase em indivíduos brancos residentes na zona rural da Normandia, todos sofrendo de doenças mentais graves. Observaram um aumento de cerca de 27% nos níveis de SOD junto com um pequeno aumento (18%) nos níveis de catalase.

O maior valor de SOD encontrado foi cerca de 1,6 vezes maior que o normal em um caso de psicose paranóide, o qual revelou também um nível bastante alto de catalase (1,4 vezes maior que o normal). Os esquizofrênicos mostraram um aumento nos níveis de SOD de 1 a 1,5 vezes enquanto que em outras psicoses (maníacos-depressivos, alucinação crônica, síndrome de Korsakoff, delírio paranóico, debilidade mental, etc.) ocorre um aumento de 1,2 a 1,5 vezes para SOD e níveis 1,0 a 1,4 vezes maiores de catalase.

Tais resultados podem sugerir que várias doenças mentais são tão relacionadas com um aumento nos níveis de SOD e que inibidores desta enzima podem, eventualmente, serem utilizados na terapia.

1.3.5. Pacientes com Hemólise Intravascular

Auclair e colaboradores (1981) dosaram os níveis de SOD em

eritrócitos de pacientes com doenças malignas e sob regime poliquimioterápico. Neste grupo, alguns pacientes que estavam sofrendo de uma hemólise intravascular inexplicável exibiram um nível extremamente baixo de SOD, enquanto que no caso de pacientes que não apresentavam hemólise intravascular, os níveis desta enzima estavam normais.

De tais resultados, concluíram um possível envolvimento de O_2^- como mediador de hemólise em células com deficiência de SOD. Esta hipótese era reforçada pelos dados de Goldgerb e Stern (1976), mostrando que um inibidor para SOD em células vermelhas, leva a um aumento na sensibilidade das mesmas à hemólise mediada por naftoquinona sulfonato, que é uma droga capaz de gerar O_2^- através de oxihemoglobina. Durán e colaboradores (1979), mostraram a formação de moléculas no estado excitado em células vermelhas (fotoquímica no escuro) e seu envolvimento em hemólise.

1.3.6. Infecção Bacteriana

Uma vez que superóxido dismutase e glutathione peroxidase protegem o organismo contra efeitos tóxicos de O_2^- e H_2O_2 gerados pelos leucócitos polimorfonucleares (PMNs) (Johnston, 1977), foram dosados os níveis destas enzimas em PMNs de crianças com infecção bacteriana e com hepatite infecciosa (Rister e colaboradores, 1979). Os resultados mostraram um aumento significativo na atividade de SOD enquanto que os níveis de GSH-Px permaneceram normais. Tendo em vista o papel de proteção de SOD contra

toxicidade por espécies ativadas de oxigênio, tais resultados podem colaborar muito para a compreensão dos aspectos patofisiológicos de procesos inflamatórios.

1.3.7. Câncer

Tem-se detectado uma diminuição nos níveis de superóxido dismutase em diversos tipos de tumores; concomitantemente, observou-se uma produção elevada de O_2^- nestas células (Oberley e colaboradores, 1979).

1.3.8. Efeito Terapêutico de SOD em Inflamações.

A utilização de SOD, injetada localmente, em diversas doenças inflamatórias foi recentemente relatada por Beckmann e Flohé (1981). A eficiência desta terapia foi estabelecida claramente em pacientes com osteoartrite inflamatória ativa na junta do joelho. Foi testada também a ação de superóxido dismutase em casos de cistite intersticial ou radioativa e observou-se uma melhora em parâmetros como dor, frequência de micção e capacidade da bexiga.

1.3.9. Tratamento com SOD de necrose pós-radioterapia e da doença de Crohn

Como comentamos anteriormente raios X provocam danos em DNA e substâncias que sequestram O_2^- protegem a célula contra esses

efeitos. Em vista disto, Emerit e colaboradores (1981) examinaram o uso terapêutico de SOD em doença de Crohn e necrose induzida por radioterapia. Três casos de necrose radioterápica, devido a superdosagens, foram tratados durante um ano, dois meses e vinte dias respectivamente. Em todos estes casos os resultados foram muito bons tendo sido comprovado a regressão da esclerose.

Também foram tratados três casos de doença de Crohn's obtendo-se bons resultados à julgar pela regressão das lesões de pele. Entretanto tais resultados ainda são preliminares e devem ser confirmados.

1.3.10. Diferenças Étnicas

Michelson e colaboradores (1977), observaram níveis de SOD cerca de 53% mais elevados em negros africanos residentes em Paris quando comparados com franceses brancos residentes na zona rural. Quanto aos níveis de catalase foram de cerca de 33% maiores que o controle. Tais resultados podem significar a existência de uma diferença étnica marcante nos níveis destas enzimas. Entretanto tal afirmação pode não ser verdadeira uma vez que os indivíduos negros eram, há muito tempo, residentes na Paris metropolitana e não podem ser diretamente comparados com indivíduos da zona rural como veremos a seguir.

Com o intuito de reforçar possíveis diferenças étnicas nos níveis destas enzimas citamos também as dosagens de SOD feitas

por Ueda e Ogata (1978) em eritrócitos de indivíduos japoneses onde os valores observados foram cerca de dez vezes maiores que os níveis relatados por Michelson e colaboradores (1977) em indivíduos franceses.

1.3.11. Comparação entre Indivíduos da Zona Urbana e Rural

A superóxido dismutase de indivíduos brancos residentes em Paris é cerca de 38% mais elevada que em indivíduos brancos da zona rural e os níveis de catalase são 22% maiores (Michelson e colaboradores, 1977). Tais resultados, segundo Michelson, sugerem profundas diferenças no metabolismo de oxigênio entre a população rural e urbana.

1.4. A Poluição em Vila Parisi

Região conhecida como "Vale da Morte" entre os especialistas em problemas ambientais, Vila Parisi, bairro de Cubatão (SP), é a região mais poluída do Brasil. São 15 mil habitantes vivendo em casas de madeira contruídas num terreno alagadiço, abaixo do nível do mar, entre o leito da Rodovia Piaçaguera-Guarujá e os trilhos da Rede Ferroviária Federal.

Segundo dados fornecidos por técnicos da CETESB (artigo publicado no Jornal da Tarde 30/04/80), nesta região há emissão diária de mil toneladas de gases e partículas poluentes despejados na atmosfera por suas 30 indústrias químicas, siderúrgicas

e de petróleo (Figura 1.2). O material particulado, nos dias de inversão térmica, chega a duplicar o índice de 600 microgramas por metro cúbico de ar o qual, segundo a Organização Mundial de Saúde, começa a ser fatal.

Uma evidência dos danos provocados por esses altos índices de poluição é a vegetação queimada da Serra do Mar. A morte desta floresta que recobre a serra, deixa imensas massas de terra e rochas expostas à ação das chuvas, o que leva à desmoronamentos ou deslizamentos das escarpas.

A situação do bairro é tão ruim que, em 1971, a Câmara dos Vereadores decidiu considerá-lo "aglomerado em extinção". Ali seria proibido executar qualquer obra pública, erguer qualquer casa. Em 1972, porém, a Câmara voltou atrás, legalizando a situação da Vila, desde então, ela nunca mais deixou de crescer.

A relação desnutrição versus poluição jamais foi estudada, assim como nunca foi feito qualquer estudo epidemiológico sobre a saúde de uma população às voltas com índices tão altos de poluentes no ar que respira. A Coordenadoria Mundial de Saúde registra para esta área índices impressionantes sobre tuberculose, bronquite, enfisema, asma crônica, doenças cardiovasculares etc.. Sabe-se também, através da Sociedade Brasileira de Ecologia Humana (Órgão da Associação Médica Brasileira), que Cubatão é considerada a capital das doenças respiratórias da América Latina.

A ocorrência de diversos casos de anencefalia e outras malformações congênitas tem sido interpretada pelo Prof. Reinaldo Azoubel, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como decorrência provável dos altos índices de poluição. Tais estudos es-

FIGURA 1.2 - Mapa da Região de Vila Parisi: 1. Cia. Santista de Papel; 2. Usina da Light; 3. Estação de tratamento da Sapesp; 4. Ultrafêrtil S/A., Indústria e Comércio de Sapesp; 5. Refinaria Presidente Bernardes; 6. Companhia Brasileira de Estireno; 7. Carbocloro Clorogil e Engedor; 8. Alba-Adria S/A.; 9. Union Carbide do Brasil; 10. Companhia Petroquímica Brasileira; 11. Fertilizantes União; 12. Companhia Siderúrgica Paulista; 13. Manah S/A., Comércio e Indústria; 14. IAP, Indústria de Fertilizantes; 15. Ultrafêrtil; 16. Rhodia Indústrias Químicas e Têxteis S/A.; 17. Refrigerantes de Santos e 18. Complexo Dow Chemical.

tão dependendo da construção urgente de um laboratório de teratogênese em Cubatão, o que já foi oficialmente confirmado pela prefeitura local.

1.5. Porfiria Aguda Intermitente

A porfiria aguda intermitente (IAP) é uma desordem genética (dominante) caracterizada por um defeito na biossíntese de heme (Marver e Schmid, 1972). Como consequência, advém excreção de excesso de precursores de porfirina na urina e, esporadicamente, ataques resultantes de disfunção neurológica. IAP pertence ao grupo das porfirias hepáticas hereditárias, onde também se incluem a coproporfiria e porfiria "variegade". Nestes três casos, o fígado é o local principal no qual se manifesta o erro na biossíntese de heme, mas o defeito genético não se limita a este órgão tendo sido demonstrado, por exemplo, em outros tecidos como eritrócitos e fibroblastos.

Clinicamente a IAP se manifesta pela excreção urinária de altos níveis de ácido δ -aminolevulinico (ALA) e porfobilinogênio (PBG) enquanto os níveis de porfirinas preformadas são normais. Assim pacientes com IAP não apresentam fotosensibilidade, em contraste com outras formas de porfiria onde ocorre formação excessiva, acúmulo e excreção de porfirinas preformadas. A doença pode estar presente sob a forma latente (níveis normais de ALA e PBG na urina) por um período de tempo indefinido. Algumas pessoas com o defeito podem ter vida normal sem experimentar um ataque agudo (ou mesmo brando) de disfunção abdominal ou neuro-

lógica. Quatro grupos de fatores "precipitantes" ou desencadeadores da IAP podem converter a doença latente em manifesta: certos medicamentos (drogas), certos esteróides (incluindo-se endôgenos), regime alimentar e infecções.

Dores abdominais e sintomas mentais geralmente precedem os ataques agudos de IAP. O quadro clínico do ataque agudo pode variar e o paciente ser então encaminhado a um gastroenterologista, cirurgião, neurologista ou psiquiatra. Nos ataques sérios, os pacientes, geralmente um adulto jovem, fica paralisado quase completamente da face aos pés, incapaz de se comunicar, deglutir ou respirar, com dor e consciente. A dor abdominal simula apendicite, obstrução intestinal e cólica renal.

1.5.1. O Defeito Enzimático em IAP

Para compreender a patogênese de IAP é importante entender a regulação da biossíntese de porfirina e de heme (Fig. 1.3) (Meyer e Schmid, 1974).

Desde que ALA é o primeiro precursor específico da via e δ -aminolevulinico sintetase (ALAS), a enzima que catalisa a etapa limitante da velocidade de biossíntese de heme, o controle do processo global provavelmente ocorre ao nível de ALAS. ALAS é uma enzima induzível de meia vida biológica relativamente curta. A síntese de ALAS no fígado é reprimida por heme e induzida por compostos de diferentes estruturas, incluindo-se agentes terapêuticos, inseticidas, carcinogênicos, esteróides endógenos e exógenos. De fato, alguns destes compostos precipitam ataques

HEMEPROTEÍNAS

FIGURA 1.3 - Biossíntese de heme.

clínicos em pacientes com IAP latente. Assim, torna-se aparente que indução mediada por drogas ou hormônios e repressão mediada por heme da produção de ALAS no fígado são os mecanismos primários pelos quais a velocidade de síntese de heme é controlada. Entretanto, o aumento da atividade de ALAS não pode explicar per si o aumento da excreção de ALA e PBG pela urina sem um aumento concomitante na excreção de intermediários tetrapirrólicos que são formados após a etapa catalisada por URO-I sintetase. Estudos de Strand e colaboradores (1972) e de Miyagi e colaboradores (1971) demonstraram que, de fato, a atividade de URO-I sintetase em pacientes com IAP é diminuída de cerca de 65% no fígado e de 50% em eritrócitos. Estas observações sugerem que a redução na atividade de URO-I sintetase reflete a lesão genética primária em IAP, a qual, por sua vez, resulta na indução secundária de ALAS devido à baixa produção de heme (Figura 1.4).

FIGURA 1.4

A relação destas anormalidades enzimáticas com as manifestações neuropsiquiátricas da doença é desconhecida (Meyer e

Schmid, 1974). Possíveis mecanismos sugeridos incluem: (1) baixos níveis de hemeproteínas ou acúmulo de precursores nas células do sistema nervoso, causado pelo defeito genético, (2) efeito tóxico dos precursores ALA e/ou PBG formados no fígado e transportados para o sistema nervoso e (3) diminuição de metabólitos críticos ou acúmulo de substâncias neurotóxicas que, embora não estejam relacionados diretamente à síntese de heme, podem ser consequência da doença.

1.5.2. Tratamento de IAP

Atualmente, aceita-se o fato de que não existe cura para casos de IAP, entretanto, tem-se discutido intensivamente sobre uma forma confiável de prevenção e tratamento de ataques agudos. As duas terapias mais divulgadas são: dieta rica em carboidratos e administração intravenosa de hematina.

1.5.2.1. Dieta rica em carboidratos

Os açúcares têm sido amplamente utilizados no tratamento de ataques agudos de IAP. Nota-se uma redução na excreção de precursores porfirínicos após dieta rica em carboidratos (Goldberg e colaboradores, 1978, referência citada em Moore e colaboradores, 1980). Bonkowsky e colaboradores (1973) observaram uma redução na atividade de ALA-sintetase em ratos submetidos a esta dieta. Entretanto a resposta clínica e química para este tipo de tratamento é muito pequena ou até mesmo nula (Xifra e colaboradores, 1980).

1.5.2.2. Administração Intravenosa de Hematina

Este tipo de tratamento, está associado segundo Moore e colaboradores (1980) com uma melhora clínica na maioria dos casos e com uma redução na excreção urinária de ALA.

A hematina está ganhando um lugar definitivo no tratamento de IAP, apesar de ainda existirem diversas controvérsias sobre seu uso, uma vez que as experiências com este tipo de terapia são ainda limitadas. Ela tem sido utilizada com relativo sucesso na prevenção de danos neurológicos permanentes em pacientes que sofreram ataques agudos. O mecanismo de ação de hematina no organismo ainda não está claro, entretanto, como em alguns pacientes sob este tratamento, observou-se uma diminuição na atividade de ALA sintetase e um aumento na atividade da URO-I sintetase, supõe-se que hematina reprime a atividade de ALA-sintetase reduzindo assim a produção total de precursores porfirínicos. Contudo tal explicação não esclarece como a atividade da URO-I sintetase aumenta nesses casos.

2. O B J E T I V O S

Como vimos na Introdução desta tese, é hoje fato firmemente reconhecido, o papel de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (e talvez outras oxidases, oxigenases e peroxidases) no controle dos níveis intracelulares de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HO^{\cdot}$, 1O_2 e outras espécies associadas. Tais espécies altamente reativas são resultantes da redução parcial de oxigênio molecular em vários processos bioquímicos. Níveis muito altos ou baixos de tais espécies representam séria ameaça ao metabolismo celular. Vários distúrbios podem daí se originar ("toxicidade por oxigênio"). Michelson e colaboradores (1977) foram os primeiros a investigar de forma intensiva e sistemática as relações entre níveis anormais destas enzimas em eritrócitos e plaquetas e diferentes síndromes de origem genética ou não, especialmente em casos de debilidade mental e vários casos psiquiátricos.

A potencialidade destes estudos tem despertado enorme interesse em um grande número de pesquisadores, como atestam, por exemplo, o "Symposium on Oxygen Free Radicals and Tissue Damage" (Ciba Foundation), realizado em Londres (1978) e a "International Conference on Molecular Mechanisms of Oxygen Toxicity" em Paris (1980).

Em linhas gerais, propomo-nos nesta tese a:

a) contribuir com o esclarecimento dos mecanismos bioquímicos responsáveis pelo dramático quadro neuropsiquiátrico que se

manifesta em portadores de porfiria aguda intermitente (IAP), estudando a possibilidade de toxicidade por espécies ativadas de oxigênio como causa dos sintomas. A abordagem experimental consiste na determinação das enzimas superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase no hemolisado de portadores sintomáticos e assintomáticos da doença e de um grupo de controle sadio. Esta proposta de trabalho se justifica plenamente ao considerar-se as seguintes características da doença:

- (i) distúrbios psíquicos antecedendo ao ataque agudo, sugerindo a possibilidade de comprometimento da biossíntese de neuromediadores e de acúmulo de endohalucinógenos;
- (ii) defeito na via biossintética de heme, o qual é grupo prostético de várias proteínas e enzimas, envolvendo transporte e metabolização de oxigênio molecular, entre elas, catalase, peroxidases e triptofano dioxigenase; e
- (iii) uso terapêutico de hemina, espécie envolvida em vários processos onde H_2O_2 , $HO_2^\bullet$ e $HO^\bullet$ estão presentes.

b) comparar os níveis eritrocitários destas tres enzimas de moradores de Vila Parisi (Cubatão, SP), talvez a comunidade mais poluída do País, com aqueles da cidade de São Paulo (controle), com o intuito de se procurar estabelecer relação entre poluição atmosférica e metabolismo de oxigênio. É sabido que diversos tipos de poluentes atmosféricos levam à oxidação de oxihemoglobina a methemoglobina ou induzem a autooxidação de hemoglobina, culminando com a lise de eritrócitos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Abreviações:

HRP - peroxidase de rábano silvestre.

GSH-Px - glutational peroxidase.

GSH - glutational reduzida.

GSSG - glutational oxidada.

GSSG-R - glutational redutase.

NBT - "nitroblue tetrazolium".

SOD - superóxido dismutase.

IAP - porfiria aguda intermitente.

3.2. Enzimas e Reagentes

As enzimas e reagentes listados abaixo foram usados tal como adquiridos dos fornecedores:

Sigma Chemical Co: acetato de sódio, ácido δ -aminolevulínico, t-butil hidroperóxido, catalase de fígado bovino, glutationa redutase, glutathiona reduzida, peroxidase de rabanete (Tipo VI), "kit" para dosagem de hemoglobina, l-metionina, NADPH, nitro "blue" tetrazolium, porfobilinogênio, superóxido dismutase bovina, superóxido dismutase de sangue humano.

Carlo Erba: bihidrogenofosfato de potássio, ferricianeto de potássio, hidrogeno fosfato de potássio, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio.

E. Merck, D: ácido acético, cloreto de sódio, etilenodiamin tetracetato (sal sódico), iodeto de potássio, riboflavina, tetrahidrofurano.

Mallinckrode Chemical Works: cianeto de potássio.

Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e as concentrações, a menos que especificado, calculadas por pesagem.

3.3. Aparelhagem

Espectrofotômetro Zeiss, Modelos DMR-10 e DMR-21

Espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-4

Fotômetro tipo Hastings-Mitchell, construído no laborató-

rio, provido de fotomultiplicadora tipo 1P28.

Centrífuga Sorvall Superspeed SS-1

Potenciômetro Metrohm, tipo E-510

Lâmpada Mineralight UVL-22

3.4. Métodos

3.4.1. Purificação de Luminol

Foi utilizada uma modificação do método sugerido por Drew e Perman (1937): uma solução concentrada de luminol em solução 5% NaOH foi resfriada a 0°C em banho de gelo. Os cristais resultantes foram dissolvidos em água e reprecipitados com adição de ácido acético 10%. A pureza do luminol foi controlada pelo espectro ultravioleta em tetrahidrofurano (ϵ em 360 nm = $7,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.4.2. Determinação de Peróxido de Hidrogênio

As dosagens de peróxido de hidrogênio, feitas segundo Cotton e Dunford (1973), baseiam-se na oxidação de iodeto por H_2O_2 , catalisada por peroxidase. O ensaio (2 ml), realizado em cela de quartzo, contém: 0.2 ml de solução de peróxido de hidrogênio, HRP (peroxidase de rãbano silvestre) $0,5 \times 10^{-8} \text{ M}$, KI 0,05 M e tampão acetato 0,1 M, pH 3,8. A reação é iniciada pela adição de KI na forma sólida e mede-se então a absorbância do íon I_3^- formado a 353 nm ($\epsilon_{\text{I}_3^-} = 2,55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.4.3. Padronização de Catalase

A atividade específica da catalase comercial (padrão) foi avaliada por meio de medidas da velocidade de desaparecimento de peróxido de hidrogênio, observada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm a 25°C:

Sendo esta uma reação de primeira ordem na concentração de peróxido de hidrogênio, a velocidade de decomposição é diretamente proporcional à concentração de enzima.

3.4.4. Determinação de Hemoglobina

Os valores de hemoglobina foram estimados pelo método de Drabkin e Austin (1935). De acordo com esta técnica, a hemoglobina total, em pH alcalino, é rapidamente convertida em cianohemoglobina que é determinada pela leitura de absorbância a 540 nm. Diluições de soluções de cianohemoglobina padrão com solução de Drabkin foram usadas para a preparação da curva de calibração (Fig. 3.1).

O sistema é constituído de solução padrão de metemoglobina humana (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 ml) e solução de Drabkin (100 partes bicarbonato de sódio, 20 partes ferricianeto de potássio e 5 partes cianeto de potássio em 1000 ml de água): 3,0, 2,0, 1,0, e 0 ml.

Na padronização do produto foi usado o seguinte coeficiente de extinção molar:

$$\epsilon \text{ (cianohemoglobina)} = 44,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

FIGURA 3.1 - Curva de calibração de hemoglobina.

3.4.5. Dosagem de Catalase via Inibição da Reação Quimiluminescente do Luminol.

A dosagem de catalase é baseada em medidas de intensidade de emissão oriunda da reação quimiluminescente entre luminol e H_2O_2 residual de um sistema de incubação catalase- H_2O_2 (Maral e colaboradores, 1977).

A cubeta de reação contém 10 μg de HRP em 3 ml de EDTA 10^{-4}M , luminol 10^{-4}M em tampão fosfato 0,1 M pH 7,8. A reação é iniciada pela injeção de 1 ml da mistura de incubação (3 ml de H_2O_2 $2,1 \times 10^{-5}\text{M}$ em tampão fosfato 10^{-2}M pH 7,8 e catalase; a incubação é feita a 25°C por 20 min.) e em seguida é dosado o peróxido de hidrogênio residual.

A curva de calibração de catalase (figura 3.2) mostra linearidade entre o logarítmo da intensidade de luz emitida pelo luminol e a concentração de H_2O_2 residual. A reação foi iniciada por injeção rápida de solução estoque de H_2O_2 no frasco de reação contido no interior do fotômetro e exposto à fotomultiplicadora, uma vez que a reação é muito rápida, com metade de luz total emitida em um minuto. Tal processo dificulta a homogeniza-

FIGURA 3.2 - Curva de calibração para as dosagens de atividade de catalase.

ção da mistura, impedindo que a dosagem seja baseada em medidas de intensidade máxima e tornando necessário o uso de medidas de emissão total. Thérèse Wilson (1976) já havia comentado este inconveniente do uso de medidas baseadas na reação quimiluminescente do luminol.

Eliminamos a possibilidade de interferentes no lisado afetarem a linearidade de resposta, testando diferentes concentrações de lisado no sistema completo (Fig. log area x μ l hemolisado inserida na Figura 3.2).

Todas as medidas foram feitas em duplicata, tendo-se constatado uma reprodutibilidade dentro de 15%.

3.4.6. Dosagem de Glutathiona-Peroxidase

O método de dosagem é baseado em medidas da velocidade de oxidação da glutathiona na forma reduzida (GSH) por um hidróperóxido, na presença de glutathiona peroxidase (GSH-Px). As medidas são feitas acoplando-se a este sistema à redução imediata da glutathiona oxidada (GSSG) por NADPH na presença de glutathiona redutase (GSSG-R).

A velocidade de formação de GSSG é medida seguindo-se o decréscimo da absorbância do NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ mol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

FIGURA 3.3 - Curva de calibração para as dosagens de atividade de GSH-Px.

A mistura de reação (3 ml) contém NADPH 2×10^{-4} M, GSH 10^{-3} M, hidroperóxido de t-butila 10^{-3} M, 3 U.I de GSSG-R e 100 μ l de lisado de sangue (Michelson e colaboradores, 1977). As medidas são feitas à 37°C.

A figura 3.3 mostra a linearidade de resposta do sistema de dosagem de glutathiona peroxidase com diferentes concentrações de lisado de sangue.

Todas as amostras foram dosadas em duplicada, tendo sido encontrado um limite de erro de cerca de 15% entre as medidas.

Segundo Zakowski e Tappel (1978), NADPH age como inibidor de GSH-Px. Decidiu-se então testar esta possibilidade, aumentando de 50% a concentração de NADPH na mistura de reação: não se observou nenhuma alteração na atividade da GSH-Px.

3.4.7. Determinação da Atividade de Superóxido Dismutase via Inibição da Redução de "Nitro Blue Tetrazolium"

A atividade da superóxido dismutase é medida segundo método descrito por Maral e colaboradores (1977), por meio da inibição da redução do nitroblue tetrazolium (NBT) por $O_2^{\cdot-}$ gerado durante a reoxidação de riboflavina fotoreduzida:

O sistema de dosagem é constituído de riboflavina 2×10^{-6} M, metionina 10^{-2} M, KCN 2×10^{-5} M e NBT $1,7 \times 10^{-4}$ M em tampão fosfato 5×10^{-2} M pH 7,8. A esta mistura, na cubeta de reação (2 ml), adiciona-se 10 μ l de lisado de sangue, e a solução final é irradiada a 365 nm utilizando-se uma lâmpada ultravioleta Mineralit UVL-22, acoplada a um banho termostaticado à 25°C cuja parede é transparente ao UV. A cela de reação é fixa da dentro do banho a uma distância de 2 cm. O tempo de irradiação é ajustado de forma tal que seja observado em um branco, na ausência de SOD, um aumento na absorbância a 560 nm de 0,20 a 0,21.

A figura 3.4. mostra linearidade da redução de NBT com a adição de diferentes concentrações de lisado de sangue.

A tabela 3.1 mostra que as medidas de absorbância, feitas através do método de inibição da redução do NBT via SOD, são confiáveis dentro de um limite de erro de cerca de 5%.

TABELA 3.1. - Precisão das medidas de inibição de redução do NBT promovida por SOD de hemolisados.

AMOSTRA DE HEMOLISADO	MEDIDA	ABSORBÂNCIA 560 nm
A	1	0,110
	2	0,115
B	1	0,135
	2	0,135
C	1	0,140
	2	0,145
D	1	0,152
	2	0,150
E	1	0,155
	2	0,155

FIGURA 3.4 - Curva de calibração para as dosagens de atividade de SOD.

Na literatura, são descritos outros métodos de dosagem de SOD, tais como:

- i . métodos enzimáticos: geração de superóxido pelo sistema da xantina oxidase, tendo como substrato xantina ou hipoxantina e como detectores: citocromo c (Salin e McCord, 1974), nitroblue tetrazolium (Beauchamp e Fridovich, 1971) e oxidação de sulfito (Tyler, 1975).
- ii . métodos fotoquímicos: produção de superóxido pela reoxidação espontânea de flavina fotoreduzida e, acoplado para detecção, o sistema de redução do citocromo c (Massey e colaboradores, 1969).
- iii. métodos químicos: por exemplo, a autooxidação de epinefrina a adrenocromo (Misra e Fridovich, 1972).

3.4.8. Preparação das Amostras de Sangue

Cerca de 4 ml de sangue são coletados dos doadores, utilizando-se o sistema "Vacutainer" da Becton Dickinson que tem citrato como anticoagulante.

A- Para as Dosagens de SOD e Catalase

Dois ml de sangue são centrifugados durante 10 min. a 3000 g e o soro removido por sucção. Então adiciona-se água destilada (1 ml) e os eritrócitos são resuspensores por agitação e lisados por duas horas a 4°C (volume do lisado, 2 ml). Para um volume de 1,8 ml deste lisado adiciona-se 0,9 ml de uma mistura de clorofórmio-etanol (3:5) e 0,3 ml de água para precipitar a hemo-

globina, a qual é centrifugada a 3000 g por 10 min. Superóxido dismutase é estimada diretamente neste lisado e a catalase determinada após diluição de 100 vezes do lisado.

B- Para a Dosagem de Glutathione Peroxidase

Um ml de sangue é centrifugado por 10 min. a 3000 g e o soro removido. Os eritrócitos são então lavados 3 vezes com solução de NaCl 0,9% e lisados com a adição de 1 ml de água seguida de congelamento a -70°C e rápido aquecimento. Este lisado é então diluído a uma concentração de 5 g de hemoglobina por 100 ml e então misturado com um volume igual de 4×10^{-3} M ferricianeto de potássio, 2×10^{-2} M KCN em 0,1 M tampão fosfato pH 7,0.

4. R E S U L T A D O S

Apresentamos, a seguir, os resultados das dosagens de SOD, GSH-Px, catalase e os níveis de hemoglobina em eritrócitos de indivíduos normais, pacientes portadores de IAP e indivíduos residentes em Vila Parisi. Os métodos analíticos e as curvas de calibração utilizados encontram-se detalhadamente descritos no Capítulo 3 deste trabalho. As atividades enzimáticas foram expressas por ml de sangue e por grama de hemoglobina. Entretanto, uma vez que uma das maiores fontes de O_2^- em eritrócitos é a degradação da hemoglobina, a expressão dos resultados por grama de hemoglobina é, segundo Michelson e colaboradores (1977) a mais precisa.

Para a avaliação da significância das diferenças encontradas entre os casos estudados e o controle, relatamos junto aos histogramas os resultados de teste estatístico não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras. Essa prova atesta se duas amostras foram extraídas da mesma população (ou de populações com a mesma distribuição). A prova bilateral é sensível a qualquer diferença das quais se extraíram as amostras, diferenças de locação, na dispersão, na assimetria, etc.. A prova de Kolmogorov-Smirnov visa a concordância entre dois conjuntos de valores amostrais. Se as duas amostras foram efetivamente extraídas da mesma população, então é de se esperar que as distribuições cumulativas de ambas as amostras sejam bastante próxi-

mas uma das outras, acusando apenas desvios aleatórios em relação à distribuição da população. Se as distribuições cumulativas das duas amostras são muito diferentes ou distantes uma da outra em qualquer ponto, isto sugere que as amostras provêm de populações distintas.

4.1. Grupo Controle

As amostras de sangue utilizadas na elaboração do grupo controle foram obtidas de doadores aparentemente saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre 17-40 anos, residentes na cidade de São Paulo, alunos da Escola de Preparação de Soldados da Polícia Militar e estudantes, professores e funcionários do Instituto de Química da USP. A tabela 4.1 contém as atividades de SOD, GSH-Px e de catalase, bem como os níveis de hemoglobina, nos eritrócitos do grupo controle. Nas figuras 4.1 a 4.6, são apresentados os histogramas correspondentes e os dados estatísticos referentes a valor médio das medidas ($\bar{X}$) e desvio padrão da média (S_x).

4.2. Indivíduos portadores de IAP

4.2.1. Caracterização dos pacientes e história da doença

Relatamos, a seguir, um resumo das características pessoais de cada paciente, quadro clínico e tipo de tratamento recebido. O diagnóstico de IAP foi efetuado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e baseado em exames clínicos

e/ou laboratoriais, sob a responsabilidade do Dr. Paulo E. Marchiori do Departamento de Neurologia Clínica daquele hospital.

CASO 1 - Indivíduo assintomático, pai da paciente caso 3.

CASO 2 - Mulher, 25 anos, branca e solteira. Foi internada em setembro de 1978, relatando que após tomar medicação anti-inflamatória motivada por dores lombares, apresentou vômitos aquosos, persistentes por sete dias. No oitavo dia de internação começou a referir "fraqueza nas pernas", perda súbita de visão, crises convulsivas tipo grande mal e emissão de urina "cor de Vinho do Porto". O exame neurológico atesta confusão mental, tetraparesia com hiperreflexia global e redução do campo visual. Foi tratada com Clonazepan, germe de trigo, dieta hipercalórica, com melhora progressiva do campo visual. Obteve alta hospitalar com redução moderada do campo visual que se normalizou três meses após. Vem sendo mantida com Clonazepan 2mg/dia, não tendo mais surtos desde então. A paciente realizou a pesquisa de URO-I sintetase em 01/09/81, na ausência de surto, que mostra 51 nmol/100g de hemácias/h (normal: 38-74 nmol/100g de hemácias/h).

CASO 3 - Mulher, 20 anos, branca e solteira. Foi internada em 25 de junho de 1980, referindo dores lombares bilaterais e disestesias na face lateral da coxa e perna direita. Não eliminava urina vermelha. O exame físico nessa época foi normal. Em 30 de junho de 1981 voltou a ser internada com as mesmas queixas. Apresentava disestesias no membro inferior direito. URO-I = sintetase = 30 nmol/100g de hemácias/h (normal: 38-74 nmol/100g

de hemácias/h). Foi tratada com clopromazina obtendo melhora clínica em 15 dias.

CASO 4 - Homem, 28 anos, preto e solteiro. Internado em 03 de janeiro de 1981, há um dia com dor abdominal em cólica, vômitos, perda de força nos membros inferiores, oito horas após ter desvio de rima bucal sem perda de consciência. Apresentava evacuações diarreicas. Tem um irmão que aos 20 anos apresentou quadro semelhante. A urina apresentava-se avermelhada. Teste de Watson-Schwartz positivo. O exame neurológico atestou paresia crural predominantemente distal, flacidez, tremores vibratórios, reflexos miotáticos distais diminuídos nos membros superiores. Patelares e aquileus diminuídos simetricamente. Parestesias em membros inferiores. Parestesia diminuída nos membros superiores e inferiores. Artrestesia conservada. Apresentou tromboflebite no membro superior esquerdo. Tem quatorze irmãos sendo que todos estão vivos. A mãe é viva e saudável. Segundo o paciente, seu pai morreu de "dor de cabeça".

CASO 5 - Mulher, 27 anos, branca e casada. Em janeiro de 1978, quatro meses após dar a luz, durante a menstruação, começou a ter dores abdominais em cólica, náuseas e vômitos. Foi medicada com antiespasmódico sem apresentar melhora. Investigada radiologicamente nada revelou. Acompanhou o quadro obstipação intestinal sonolência, palavras mal articuladas, frases desconexas. Urina cor de "vinho do Porto". O pai com 61 anos é saudável, a mãe com 56 anos é nervosa. Teve uma irmã que faleceu aos 23 anos com IAP. Apresentou sensação de parestesia nos membros inferiores. Teste de Watson-Schwartz positivo.

CASO 6 - Mulher, 27 anos, branca e casada. Em abril de 1979 começou a apresentar queda acentuada de cabelos que instalou-se de maneira abrupta. Em maio do mesmo ano começou a sentir dor em choque de grande intensidade na extremidade do pé esquerdo, dor esta acompanhada de dormência que ascendeu até a raiz do membro inferior esquerdo de maneira progressiva ao cabo de mais ou menos dois meses. Em outubro de 1979, teve sensação de dormência no pé direito que também ascendeu para a raiz do respectivo membro em algumas semanas. Ainda nessa data teve episódio de instalação aguda de dores dispersas pelo corpo, acompanhadas de falta de ar. Em novembro teve quadro alucinatório de instalação aguda que perdurou por apenas um dia e teve remissão espontânea. Foi internada em hospital em dezembro de 1979 com quadro de vômitos incoercíveis. Prova de Watson-Schwartz positiva.

CASO 7 - Mulher, 26 anos, branca e solteira. Foi internada em 30 de agosto de 1978. Aos 15 anos de idade começou a ter dor lombar intensa, irritabilidade e crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas. Medicada com Fenobarbital 100mg/dia e Hidantoinato 300mg/dia não teve melhora. Há um ano apresentava urina de cor avermelhada, disúria, dor lombar e abdominal sendo submetida a cirurgia vesical. Seis meses após teve quadro infeccioso apresentando fraqueza súbita nos quatro membros que a impedia de segurar objetos e deambular. Há um mês julho de 1978 apresentava retração nas mãos e intensificação das crises dolorosas abdominais que se tornaram constantes. Apresentava dores generalizadas, períodos de diarreia, vômitos e emagrecimento acentuado há 6 meses. Pai falecido e mãe sem antecedentes seme-

lhantes. Um irmão apresentava crises convulsivas mas morreu por afogamento. Exame neurológico: flexão máximas das mãos, flexão dos antebraços sobre os braços; extensão dorsal dos pés; não se mantêm em pé. Tetraparesia distal, hipotonia da musculatura; reflexos profundos presentes e simétricos com exceção dos aquilianos e flexores dos dedos. Hiposensibilidade tátil e térmica em luva de cano longo e nos membros inferiores até um terço proximal da coxa. Teste de Watson-Schwartz positivo. Enquanto foi tratada com Carbamarepin apresentou crises convulsivas, dores abdominais intensas e urina avermelhada. Foi tratada com hematina em 12 de abril de 1978, apresentou melhora discreta do quadro. Em seguida utilizou-se Clorozepan 4mg, a partir de então houve melhora gradativa de fundo clínico, voltando a deambular porém com melhora da tetraparesia tendo vida útil e ativa. Até outubro de 1981 não apresentou novas crises.

CASO 8 - Homem, 25 anos, branco e solteiro. Foi internado com história anterior de 15 dias com dores abdominais e cólicas lombares. Uma semana após mostrou formigamento e fraqueza nas pernas, ascendente, e dificuldade de micção associada a urina avermelhada. Este quadro evoluiu para falta de ar e dificuldade para realizar movimentos. O exame neurológico apontou tetraparesia, arreflexia generalizada e sensibilidade tátil. Teste de Watson-Schwartz positivo. Foi medicado com hematina 250 mg/12 horas por seis dias. Houve sinais de remissão do surto, porém a melhora da motilidade atingiu o máximo em quatro meses.

CASO 9 - Homem, 48 anos, branco e casado. Foi internado em maio de 1980 com episódios repetidos de dores abdominais em

cólicas, difusas e emissões de urina "cor de vinho do Porto". Obstipação intestinal associada. O quadro revelou também dores em ambos os membros inferiores. Apresentou dores abdominais difusas à palpação profunda. Foi tratado com Clorpromazina 200mg/dia, obtendo alta hospitalar duas semanas após.

CASO 10 - Mulher, 23 anos, branca e solteira. Foi internada em 13 de agosto de 1980 revelando haver dado à luz há dois meses. Uma semana após, apresentou náuseas e vômitos alimentares sem outros comemorativos. Quinze dias antes da internação apresentou cólica abdominal, difusa, irradiando-se para a região lombar com emissão de urina avermelhada. Há três dias tinha febre e não se mantinha mais em pé. Exame genitourinário: emissão de urina avermelhada. Antecedentes familiares: tio paterno morreu de causa indeterminada. Abdome: flácido, doloroso à palpação profunda no hipogástrico. Exame neurológico revelou confusão mental, tetraparesia assimétrica, arreflexia universal, mobilidade do diafragma diminuída, paresia do 9º e 10º pares cranianos, com déficit de motilidade do palato mole. Teste de Watson-Schwartz positivo. O quadro evoluiu rapidamente para insuficiência respiratória sendo entubada e colocada em respiração assistida. Recebeu tratamento com hematina (180 mg de 12/12h) em 14 de maio de 1980 até 15 de maio de 1980. Tomou 4 infusões, revelando nesse período discreta melhora dos movimentos do membro superior direito. Em 16 de maio de 1980, durante a realização de traqueostomia teve parada cardiorespiratória irreversível.

CASO 11 - Homem, 25 anos, pardo e solteiro. Foi internado em 27 de março de 1981 com quadro de dores abdominais em cô

licas, difusa, urina cr clara e fraqueza nos quatro membros h um ms. Dores nas massas musculares, tetraparesia assimtrica, aneflexa generalizada. ALA: 5,9 (normal 1,3-7,0) mg/d. PBG: 5,2 (normal 1-1,5) mg/d. URO porfirina: 263 mg/1400 ml (normal 1-25mg/1400 ml). Coproporfirina: 183 µg/1400 ml (normal 20-200 µg/1400 ml). Foi medicado com hematina 240mg (4 mg/kg) em 11 doses e be tabloqueadores. No obteve melhora com hematina, foi reprimida a atividade da doena.

CASO 12 - Mulher. Em janeiro de 1981, sofreu cirurgia de urgcia com diagnstico de prenhez ectpica, apresentava dor abdominal e amenorria. Recebeu alta com fraqueza nos membros inferiores, dificuldade de deambulao e urina escura. Evoluu para fraqueza nos membros inferiores e dificuldade para se alimentar e pentear o cabelo. Como sentia dificuldade para respirar, foi internada em unidade de terapia intensiva por dez dias. Exame de Watson-Schwartz positivo. Exame neurolgico revelou tetraparesia de predmio proximal nos membros superiores mas tambm com acometimento distal (extenso dos punhos e dedos bilateralmente). Exames laboratoriais: ALA = 1,5 (1,3-7,0) mg/d., PBG = 4,3 (1,0-5,0) mg/d., coproporfirina = 360 (20-200) µg/d., uroporfirina = 140 µg/1400 ml (1-25 µg/1400 ml).

4.2.2. Nveis de SOD, GSH-Px e Catalase em Portadores de IAP.

A tabela 4.2 contm as atividades de SOD, GSH-Px e catalase, bem como os nveis de hemoglobina nos eritrcitos de paciente com IAP. As figuras 4.7 a 4.12, mostraram a distribuio das doses

gens enzimáticas em eritrócitos de indivíduos portadores de IAP. Estão representados, em linha tracejada, os histogramas controle para melhor visualização das diferenças encontradas. Não estão mostrados os valores da média e desvio padrão dessas medidas, uma vez que esses cálculos não têm significado estatístico dado ao tamanho da amostragem ($n = 12$). Junto às legendas de cada figura são indicados os resultados do tratamento estatístico não paramétrico de Komogorov e Smirnov.

Só foram discriminados os indivíduos assintomáticos daqueles em crise aguda no histograma que mostra a atividade de SOD/g hemoglobina, pois, só neste caso foi encontrada diferença significativa entre esses dois grupos de pacientes.

Testou-se o efeito de ALA ($1,0 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-4}$, $5,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ M) e de PBG ($1,0 \times 10^{-4}$, $2,5 \times 10^{-4}$, $5,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ M) na atividade enzimática de SOD bovina, da SOD e GSH-Px presentes no hemolisado: não foram observadas quaisquer alterações nas atividades.

4.3. Indivíduos Residentes em Vila Parisi

Coletou-se amostras de sangue de doadores de ambos os sexos residentes em Vila Parisi, com idade entre 15-45 anos. Todos os doadores residem na vila há mais de um ano, são aparentemente saudáveis e não estavam sob tratamento com medicamentos.

A tabela 4.3 contém as atividades de SOD, GSH-Px e catalase, assim como os níveis de hemoglobina em eritrócitos de residentes de Vila Parisi. Nas figuras 4.13 a 4.18, são apresentados os histogramas correspondentes e os dados estatísticos referentes a valor médio das medidas ($\bar{X}$) e desvio padrão da média (S_x). Junto às legendas de cada figura são indicados os resultados do tratamento estatístico não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov.

TABELA 4.1 - Níveis de SOD, GSH-Px, catalase e hemoglobina em eritrócitos de indivíduos normais^a.

CASO	HEMOGLOBINA g/100 ml	SOD		GSH-Px		CATALASE	
		U/g Hb	U/ml	μM/g Hb	μM/ml	μg/g Hb	μg/ml
1	14,8	513	76	-	-	-	-
2	14,4	539	77	-	-	2392	354
3	12,3	510	63	-	-	2222	320
4	13,2	561	74	-	-	3003	396
5	13,6	425	58	-	-	-	-
6	13,6	501	68	-	-	-	-
7	12,3	375	46	-	-	-	-
8	14,8	493	73	10,0	1,5	1198	177
9	13,2	498	66	15,0	2,0	1555	205
10	13,2	498	66	10,0	1,3	922	121
11	13,6	634	86	16,0	2,2	1099	149
12	12,6	530	67	12,0	1,5	3426	452
13	12,8	419	54	9,0	1,2	1957	250
14	12,9	354	46	10,0	1,3	1658	212
15	14,2	325	46	11,0	1,6	1540	216
16	12,0	583	70	7,7	0,9	2608	313
17	15,0	404	61	14,0	2,1	1958	297
18	13,2	590	78	13,0	1,7	2372	313
19	14,0	500	70	-	-	2152	299
20	14,8	527	78	-	-	2209	327
21	14,0	557	78	23,0	3,2	2140	306
22	15,8	596	94	-	-	2597	410
23	15,5	477	74	7,0	1,1	2603	403
24	15,8	584	92	13,0	2,0	2550	403
25	17,0	434	74	7,0	1,2	2370	403
26	15,8	468	74	10,0	1,6	2550	403
27	17,2	535	92	10,5	1,8	2587	445
28	16,2	455	74	7,7	1,2	2362	328
29	16,8	547	92	8,0	1,4	2588	445
30	17,0	507	87	-	-	2526	424
31	15,8	386	61	16,0	2,5	2069	327
32	13,2	-	-	-	-	2635	348
33	15,1	-	-	-	-	2280	344
34	13,9	-	-	-	-	2602	361
35	13,1	-	-	-	-	2496	327
36	-	-	-	-	-	-	-
37	16,7	-	-	12,0	2,0	-	-

a) Os métodos de dosagem utilizados estão descritos no Capítulo 3.

TABELA 4.2 - Níveis de SOD, GSH-Px, catalase e hemoglobina em eritrócitos de indivíduos normais e portadores de IAP assintomáticos e em crise aguda.

CASO	HEMOGLOBINA g/100 ml	SOD		GSH-Px		CATALASE	
		U/g Hb	U/ml	µM/g Hb	µM/ml	µg/g Hb	µg/ml
IAP Assintomá- ticos							
1	14,2	612	87	-	-	2630	368
2	15,2	633	96	30,0	4,6	2450	372
3	14,5	636	92	19,7	2,8	-	-
4	16,2	600	97	21,0	3,4	-	-
5	12,0	650	78	28,0	3,4	2608	313
6	14,3	700	100	-	-	2640	377
7	12,7	628	80	-	-	2400	305
8	14,0	728	102	-	-	2186	306
IAP Crise Aguda							
9	12,6	960	121	18,0	2,3	1390	175
10	13,9	850	118	-	-	2390	332
11	12,4	1100	136	18,0	2,2	1080	134
12	11,8	118	119	19,0	2,3	1690	198

TABELA 4.3 - Níveis de SOD, GSH-Px, catalase e hemoglobina em eritrócitos de indivíduos residentes em Vila Parisi.

CASO	HEMOGLOBINA g/100 ml	SOD		GSH-Px		CATALASE	
		U/g Hb	U/ml	µM/g Hb	µM/ml	µg/g Hb	µg/ml
1	18,8	477	90	31,0	5,8	962	180
2	18,8	558	105	31,0	5,8	-	-
3	14,2	580	82	34,0	4,8	-	-
4	14,2	632	90	41,0	5,8	2155	306
5	18,5	632	117	26,0	4,8	3459	639
6	17,8	663	118	20,0	3,6	2110	376
7	13,4	670	90	31,0	4,1	776	104
8	13,8	702	97	24,0	3,3	756	104
9	13,0	746	97	26,0	3,4	2353	306
10	15,1	788	119	23,0	3,5	3225	487
11	15,1	788	119	27,0	4,0	2580	390
12	14,8	804	119	28,0	4,1	2816	417
13	14,8	806	119	26,5	4,0	2186	323
14	14,4	826	119	21,0	3,0	2898	417
15	13,9	856	119	26,0	3,6	2602	417
16	13,9	856	119	23,0	3,2	2604	362
17	13,8	862	119	27,0	3,7	2217	306
18	12,7	1110	141	23,0	2,9	2543	323
19	16,0	1000	160	8,2	1,3	434	70
20	16,0	1019	163	9,0	1,4	913	146
21	9,0	1600	144	11,0	1,0	387	35
22	9,0	1600	144	15,0	1,3	859	76
23	11,6	1470	171	9,5	1,1	1379	160
24	8,1	-	-	11,81	1,0	556	45

FIGURA 4.1 - Distribuição dos valores em eritrócitos de indivíduos sadios.

FIGURA 4.2 - Distribuição dos valores de SOD em eritrócitos de indivíduos sadios.

FIGURA 4.3 - Distribuição dos valores de GSH-Px em eritrócitos de indivíduos sadios.

FIGURA 4.4 - Distribuição dos valores de GSH-Px em eritrócitos de indivíduos sadios.

FIGURA 4.5 - Distribuição dos valores de catalase em eritrócitos de indivíduos sadios.

FIGURA 4.6 - Distribuição dos valores de catalase em eritrócitos de indivíduos sadios.

FIGURA 4.7 - Distribuição dos valores de SOD em eritrócitos de indivíduos portadores de IAP. Teste de Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,96$ ($\alpha = 0,05$).

FIGURA 4.8 - Distribuição dos valores de SOD em eritrócitos de indivíduos portadores de IAP. Teste de Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,64$ ($\alpha = 0,05$).

GURA 4.9 - Distribuição dos valores de GSH-Px em eritrócitos de indivíduos portadores de IAP. Teste de Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,88$ ($\alpha = 0,05$).

FIGURA 4.10 - Distribuição dos valores de GSH-Px em eritrócitos de indivíduos portadores de IAP. Teste de Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,81$ ($\alpha = 0,05$).

FIGURA 4.11 - Distribuição dos valores de catalase em eritrócitos de indivíduos portadores de IAP. Segundo teste de Kolmogorov-Smirnov as duas amostras pertencem

FIGURA 4.12 - Distribuição dos valores de catalase em eritrócitos de indivíduos portadores de IAP. Segundo teste de Kolmogorov-Smirnov as duas amostras pertencem a mesma população.

FIGURA 4.13 - Distribuição dos valores de SOD em eritrócitos de indivíduos residentes em Vila Parisi. Teste de Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,70$ ($\alpha = 0,05$).

FIGURA 4.14 - Distribuição dos valores de SOD em eritrócitos de residentes em Vila Parisi. Teste de Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,8$ ($\alpha = 0,05$).

FIGURA 4.13 - Distribuição dos valores de GSH-Px em eritrócitos de residentes em Vila Parisi. Teste de Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,7$ ($\alpha = 0,05$).

FIGURA 4.16 - Distribuição dos valores de GSH-Px em eritrócitos de indivíduos residentes em Vila Parisi.

Teste de Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,55$ ($\alpha=0,05$).

FIGURA 4.17 - Distribuição dos valores de catalase em eritrócitos de indivíduos residentes em Vila Parisi. Segundo teste de Kolmogorov-Smirnov as duas amostras

FIGURA 4.18 - Distribuição dos valores de catalase em eritrócitos de indivíduos residentes em Vila Parisi. Segundo teste de Kolmogorov-Smirnov as duas amostras

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1. Metodologia

Um exame cuidadoso da literatura quanto às concentrações eritrocitárias de SOD de indivíduos normais revela enorme dispersão dos resultados obtidos por diversos autores (tabela 5.1). Esta aparente inconsistência pode refletir sérios problemas em relação à metodologia utilizada, talvez de padronização, o que comprometeria a comparação de nossos resultados (490 unidades de SOD/g de hemoglobina) com aqueles relatados na literatura. Outrossim, não se pode excluir a possibilidade de que tais diferenças expressem uma variação real na atividade de SOD devido a condições ambientais particulares (pressão de oxigênio, poluição atmosférica, etc.) ou também que a atividade dessa enzima varie com a etnia do grupo controle, uma vez que japoneses, franceses e africanos apresentaram níveis de SOD tão diversos.

É, portanto, importante que se dedique maior atenção à padronização dos métodos disponíveis e se conclua sobre a exatidão deles dentro de limites confiáveis. Seria interessante, por exemplo, verificar se a atividade enzimática medida por determinado método é a mesma no hemolisado e no eluado de filtração em gel do lisado. Enquanto isso, os dados da literatura sobre os níveis de SOD em eritrócitos de determinada amostragem devem ser analisados não como medidas absolutas mas sim em termos das diferenças relativas a um grupo controle.

TABELA 5.1. - Concentração eritrocitária de SOD em Indivíduos Normais.

REFERÊNCIA	CIDADE	MÉTODO (fonte de O_2^- /sistema detector)	U/g Hb ($\mu g/g$ Hb)
Michelson e colaboradores (1977)	Paris	Flavina/NBT	1225 ± 120 ($461,4 \pm 45,7$)
Ueda e Ogata (1978)	Okayama	Xantina-xantina oxidase/NBT	15500 ± 2900
Okahata e colaboradores (1980)	Hiroshima	Flavina/cit c	13700 ± 1700
Gerli e colaboradores (1980)	Milão	_____	(700 ± 146)
Del Villano e colaboradores (1980)	Cleveland	Radioimun.	(815)

A falta de homogeneidade na apresentação dos resultados constitui outro problema, pois a diversificação na forma de expressar atividade de SOD (unidades de SOD/g hemoglobina, unidades de SOD/ml de sangue, μ g SOD/ml de células empacotadas, etc.) dificulta a comparação direta dos dados, como também uma análise das variações existentes nos diferentes grupos populacionais.

5.2. Níveis de SOD, Catalase e GSH-Px em Eritrócitos de Indivíduos Portadores de IAP.

Como comentamos na Introdução, a relação entre as anormalidades enzimáticas na biossíntese do grupo heme nos casos de IAP e as manifestações neuropsiquiátricas da doença é ainda desconhecida (Meyer e Schmid, 1974). O envolvimento de heme e de hemeína (no que diz respeito ao defeito genético e à terapia, respectivamente), as quais são fontes putativas de espécies ativadas, bem como o quadro neuropsiquiátrico, foram o ponto de partida do presente trabalho. Nossa abordagem experimental, qual seja a de estudar metabolismo de oxigênio em portadores de IAP via dosagem das enzimas-chave em eritrócitos como células-modelo, justifica-se pelo fato de a deficiência na biossíntese de heme ter sido demonstrada em células hepáticas, nervosas, eritrócitos e fibroblastos (Meyer e Schmid, 1974).

A dosagem de SOD eritrocitária em portadores de IAP mostrou um aumento de cerca de duas vezes nos níveis desta enzima em pacientes durante crise aguda e de cerca de 1,5 vezes nos portadores assintomáticos de IAP (Fig. 4.7 e 4.8). A aplicação do teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov comprova que os ní-

veis de SOD no grupo controle e em indivíduos portadores de IAP são distintos com um nível de significância de 0,05.

Estes resultados podem ser interpretados seguindo duas linhas diferentes:

Uma primeira possibilidade é de que, devido aos altos níveis de SOD no eritrócito destes pacientes, o par $O_2^-/HO_2^\cdot$ ocorreria em baixas concentrações. Lembramos aqui que espécies ativas de oxigênio desempenham papel importante em processos biológicos tais como:

(i) Os leucócitos, durante a fagocitose, apresentam um aumento repentino no consumo de O_2 . Está claro atualmente que O_2^- e H_2O_2 são produzidos durante esse processo, sendo responsáveis pela ação antimicrobiana dessas células especializadas (Ross e Weening, 1979).

(ii) A degradação oxidativa de certos alucinógenos como a triptamina ocorre provavelmente via O_2^- . De fato, essa espécie parece participar do mecanismo de reação da enzima que catalisa a clivagem oxidativa de indolaminas substituídas ou não como triptofano, 5-hidroxitriptofano, triptamina e serotonina (Hirata e Hayaishi, 1977).

(iii) A formação do neuromediador noradrenalina a partir de dopamina é catalisada pela dopamina β -hidroxilase, que é uma monoxigenase que contém cobre e requer ascorbato para uma atividade máxima:

Liu e colaboradores (1974) mostraram que a hidroxilação catalisada por essa enzima é diminuída com a adição de SOD, sugerindo um possível envolvimento de O_2^- no seu mecanismo de ação. Entretanto, como esses resultados estão sendo contestados por diversos autores (Diliberto e Kaufman, 1977), tal mecanismo precisa ser confirmado.

Levando em conta os dois últimos itens, poder-se-ia sugerir que nos casos de IAP uma diminuição da concentração intracelular de O_2^- levasse ao bloqueio destes processos, comprometendo assim a neurotransmissão e a destruição oxidativa de halucinógenos. Este tipo de argumento foi usado por Michelson e colab. (1977) para explicar vários casos de aberrações mentais em algumas doenças hereditárias e outras adquiridas.

Uma segunda possibilidade seria a interpretação com base na indução de SOD. Como oxigênio é um conhecido indutor desta enzima (Crapo e Tierney, 1974), os níveis elevados de SOD em portadores de IAP podem advir como resposta metabólica a concentrações excessivas de espécies ativadas de oxigênio. Tais espécies, são extremamente tóxicas podendo levar a:

(a) aumento na oxidação de vários neuromediadores como a epinefrina (Misra e Fridovich, 1972), causando por exemplo, aberrações mentais;

(b) diversos trabalhos, mostraram que a adição de SOD ao meio de suspensão protege E.coli B (Gregory e Fridovich, 1973), E.coli K.12 (Hassan e Fridovich, 1977), Saccharomyces cerevisiae (Gregory e colaboradores, 1974) e pulmão de rato (Crapo e Tierney, 1974) contra os efeitos tóxicos de oxigênio. Portanto, a

proteção desta enzima extracelularmente sugere que as membranas são possíveis alvos de espécies ativas de O_2 . Assim diversos problemas hepáticos poderiam surgir como consequência de danos nas membranas das células e de partículas subcelulares como mitocôndrias de fígado.

Nossos estudos com indivíduos portadores do defeito IAP revelaram um aumento de cerca de duas vezes nos níveis eritrocitários de GSH-Px em relação ao controle, resultado este também confirmado por tratamento estatístico não paramétrico de (Kolmogorov-Smirnov (Fig. 4.9 e 4.10). Observou-se para o grupo controle (Fig. 4.3 e 4.4) uma atividade de GSH-Px em torno de 11,5 μM NADPH/min/g Hb a $37^\circ C$. Maral e colaboradores (1977) encontraram para indivíduos normais uma atividade média de 5,73 μM NADPH/min/g Hb, medida a $25^\circ C$.

A enzima GSH-Px tem sido apontada como responsável por processos biológicos importantes, tais como:

(a) Proteção de lipídeos insaturados em membranas. Este papel da GSH-Px tem sido discutido por diversos autores, com base em evidências como: capacidade desta enzima de catalisar a redução de hidroperóxidos de ácidos graxos (Little e O'Brien, 1968); prevenção, pela GSH-Px, da degradação oxidativa de fosfolipídeos e concomitante formação de malonaldeído em membranas internas de fígado de rato (Flohé e Zimmermann, 1974) e acúmulo de produtos de degradação de lipídeos insaturados, in vivo, através de inibição de GSH-Px (Omaye e colaboradores, 1975). Ressaltamos aqui, que condições onde uma alta taxa de remoção de peróxidos lipídicos é necessária, como a exposição a ozônio (Chow e

Tappel, 1972) ou a ingestão de peróxidos lipídicos (Reddy e Tappel, 1974), levam a um aumento na atividade desta enzima.

(b) Mutagênese- Os peróxidos são considerados como mutagênicos e a GSH-Px reagindo com hidroperóxidos de ácidos nucleícos e seus precursores (Cristophersen, 1969), teria um papel no bloqueio de tais processos. Tal hipótese é reforçada pela observação de relações entre o suprimento de selênio, elemento essencial à atividade catalítica de GSH-Px, e a incidência de câncer. Suplementação de doses subtóxicas de selênio diminuem a incidência de tumores em diversos modelos de carcinogênese química, bem como em alguns tumores mamários em camundongos (Jacobs e colaboradores, 1977). Por outro lado, alguns estudos epidemiológicos têm revelado uma relação inversa entre dieta com selênio e mortalidade por câncer (Schrauzer e colaboradores, 1977). Portanto, é necessário aprofundar esses estudos com o intuito de se esclarecer a vinculação entre a teoria fundamentada na remoção de hidroperóxidos mutagênicos e os resultados empíricos derivados dos estudos epidemiológicos.

(c) Biossíntese de prostaglandinas- Ainda não está claramente estabelecido o envolvimento de GSH-Px na biossíntese de prostaglandinas. Entretanto, recentes estudos neste campo levaram à descoberta de diversos peróxidos, intermediários na reação em cascata do ácido araquidônico. A figura 5.1 mostra um esquema da biossíntese de prostaglandinas, indicando os possíveis sítios onde GSH-Px intervem. Uma vez que as fontes de prostaglandinas - o ácido araquidônico e outros ácidos graxos polinsaturados - devem ser protegidas contra degradações oxidativas inespecíficas, a ação de GSH-Px provavelmente garante a operação

FIGURA 5.1 - Possíveis sítios de interação de GSH-Px com a reação em cascata do ácido araquidônico (AA): HPETE, ácido 12-hidropoxieicosatetraenônico; HETE, ácido 12-hidroxieicosatetraenônico; G, prostaglandina G₂; E, prostaglandina E₂; I, prostaciclina; TXA, tromboxano A₂; H, prostaglandina H₂.

nalidade desses substratos indispensáveis.

É também digna de nota a descoberta por Gryglewski e colaboradores (1976) de que a formação de prostaciclina é inibida por hidroperóxidos de ácidos graxos. A GSH-Px poderia então manter a concentração desses hidroperóxidos suficientemente baixa para garantir a formação dessa espécie. Uma vez que a prostaciclina do endotélio arterial antagoniza a adesão de plaquetas e a agregação induzida por tromboxano A_2 (TXA na fig. 5.1), uma deficiência em GSH-Px nas células endoteliais favoreceria um aumento patológico na adesão das plaquetas levando ao desenvolvimento de ateromatoses (Flohé, 1979). Esses dados são reforçados por estudos epidemiológicos feitos nos Estados Unidos, os quais revelaram que a taxa de mortes por doenças cardiovasculares correlaciona-se inversamente com o suprimento de selênio (Schamberger, 1976).

Em conclusão, a GSH-Px certamente está envolvida no controle de diversos processos biológicos. Situações onde é necessária uma alta taxa de remoção de peróxidos lipídicos levam a um aumento nos níveis de GSH-Px. Pode-se sugerir, portanto, que nos casos de IAP estudados, a elevação de cerca de duas vezes no nível desta enzima reflete uma resposta metabólica a níveis celulares excessivos de hidroperóxidos. Este fato deve estar relacionado com o aumento paralelo (também de duas vezes) na atividade de SOD dos mesmos pacientes, uma vez que a dismutação de O_2^- via SOD gera peróxido de hidrogênio.

Não foram observadas diferenças entre os níveis de catalase de indivíduos normais e portadores de IAP. De certa maneira,

estes resultados eram esperados, uma vez que a catalase provavelmente controla os níveis de H_2O_2 em apenas alguns compartimentos celulares como microsomas, núcleo e peroxissomas (Flohé e Schlegel, 1971), ficando a GSH-Px responsável pela remoção da H_2O_2 nos demais compartimentos onde a concentração de catalase é baixa. A GSH-Px exerce portanto um "controle fino" dos níveis de peróxidos nas células, cabendo à catalase entrar em ação em situações de emergência quando o nível de H_2O_2 sobe demasiadamente.

A administração intravenosa de hemina (4 mg/kg duas vezes ao dia) a dois pacientes sob crise aguda não alterou a atividade das três enzimas, dosadas dois dias consecutivos antes e três dias consecutivos após o tratamento. Contudo, nestes casos, a hemina também se mostrou ineficiente na redução dos sintomas neuropsíquicos. De fato, ainda existe muita controvérsia sobre o uso desta droga e de carboidratos no tratamento de IAP (Moore e colaboradores, 1980).

Segundo Meyer e Schmid (1974), um dos possíveis mecanismos, que explicam a relação causa-efeito entre as anormalidades enzimáticas na biossíntese do grupo heme e as manifestações neuropsiquiátricas em pacientes portadores de IAP, consiste no acúmulo de ALA e/ou PBG no sistema nervoso, após sua formação no fígado e transporte para aquele sistema. A adição de ALA e PBG aos sistemas de dosagem das enzimas em estudo, entretanto, não provoca nenhuma alteração na atividade das mesmas, o que excluiria à primeira vista, um possível efeito destes precursores na atividade de SOD e GSH-Px.

Tendo em vista os argumentos que acabamos de citar e dados publicados por Michelson e colaboradores (1977), onde diversas doenças mentais estão associadas com níveis alterados de SOD e GSH-Px (Tabela 5.2), pode-se sugerir o envolvimento de espécies ativas de oxigênio nas manifestações neuropsiquiátricas em IAP. Nossa proposta dá suporte a um dos mecanismos postulados por Meyer e Schmid (1974), segundo o qual "os distúrbios psíquicos em IAP poderiam estar relacionados com a diminuição de metabólitos críticos ou acúmulo de substâncias neurotóxicas que embora não estejam diretamente relacionadas à síntese de heme, podem ser consequência da doença".

Ressaltamos aqui, a importância da contribuição deste trabalho para a elucidação dos mecanismos bioquímicos responsáveis pelas manifestações neuropsíquicas em indivíduos portadores de IAP. O desconhecimento, até o momento, de tais mecanismos evidentemente emperra a descoberta de novas terapias para esta terrível doença que aflige grande número de portadores, acarretando muitas vezes sua morte quando entram em crise aguda. Nossos resultados reforçam também as tentativas de correlação entre a formação biológica e utilização de espécies ativas de oxigênio e distúrbios mentais, efetuadas por Michelson e colaboradores (1977) e diversos outros grupos.

5.3. Atividades eritrocitárias de SOD, catalase e GSH-Px de residentes em Vila Parisi (Cubatão, SP).

Vimos na Introdução que os níveis de SOD em eritrócitos de parisienses eram cerca de 33% mais elevados do que de indivíduos

TABELA 5.2 - Concentrações eritrocitárias de SOD, Catalase e GSH-Px em pacientes com doenças mentais.

DOENÇA	SOD μg/g Hb	GSH-Px μM NADPH/ min/g Hb	CATALASE μg/g Hb	REF.
Trisomia 21	679,4±62,8 (461,4±45,8) ^a	8,89±1,91 (5,73±1,54)	3 841± 525 (4 043±638)	Michelson e col. (1977)
Trisomia 21	-	44,2 ± 7,15 (29,5±3,55)	-	Agar e Hingston (1980)
Retardamen- to mental não mongol- óide.	-	35,2±7,62 (29,5±3,55)	-	Agar e Hingston (1980)
Autismo In- fantil.	537,9±12,9 (461,4±18,7)	4,7±0,29 (8,45±0,95)	-	Golse e col. (1978).
Psicose Pa- ranóica.	714 (461,4±45,8)	-	5 872 (4 043±638)	Michelson e col. (1977)
Esquizofre- nia	504 ± 682 (461,4±45,8)	-	-	Michelson e col. (1977)

a. Estão relatados em parênteses os níveis enzimáticos dos indivíduos normais.

residentes na zona rural da França, enquanto que não se detectou variações em sua atividade catalásica (Michelson e colaboradores, 1977).

Nossos resultados, obtidos na dosagem de SOD, catalase e glutathiona peroxidase nos hemolisados de residentes de Vila Parisi, comunidade submetida diariamente a níveis altíssimos de poluição atmosférica, mostraram que:

(i) os níveis de SOD em eritrócitos de residentes de Vila Parisi são cerca de 1,5 vezes maiores que em indivíduos residentes na cidade de São Paulo (grupo controle). Veja Fig. 5.13 e 5.14;

(ii) os níveis de GSH-Px apresentam um aumento de cerca de duas vezes em relação ao controle (Fig. 5.15 e 5.16);

(iii) eritrócitos de residentes em Vila Parisi e São Paulo apresentaram níveis semelhantes de catalase (Fig. 5.17 e 5.18).

Nestes três casos, entretanto, notou-se uma dispersão das medidas individuais numa faixa bem mais ampla que a do controle. Mesmo assim, e considerando o pequeno tamanho da amostra ($n=23$), a aplicação do teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov revelou que os níveis de SOD e GSH-Px em residentes de Vila Parisi são realmente distintos dos níveis destas enzimas no grupo controle, com um nível de significância de 0,05. Tais diferenças refletem claramente profundas alterações metabólicas envolvendo oxigênio na amostra-alvo em relação ao controle.

Certamente, seria interessante aumentar nossa amostragem de Vila Parisi e comparar os resultados com aqueles de morado-

res de vilas não poluídas do litoral paulista, de residentes de cidades do interior de São Paulo, ou mesmo de indivíduos residentes na cidade de Cubatão, a qual segundo depoimento do Dr. Ney Eduardo Serra, delegado da CIESP para a região de Cubatão (debate promovido pelo jornal "Folha de São Paulo" em 26/10/81), apresenta índices de poluição atmosférica inferiores aos da cidade de São Paulo.

Num trabalho independente, Naoum e colaboradores (comunicação pessoal), encontraram que 33,9% da população de Cubatão padece de metahemoglobinemia e 35,4% de sulfohemoglobinemia, sendo que em algumas amostras de glóbulos vermelhos foram encontrados inclusive corpos de Heinz. Por outro lado, segundo Carrel e colaboradores (1975), qualquer fator que leve a um aumento na flexibilidade ou distorção da conformação da hemoglobina, deixando o grupo heme mais exposto, pode resultar em uma elevação na concentração de metahemoglobina e concomitante formação de íons superóxido. Está atualmente bem estabelecido que diversas moléculas orgânicas, agentes redox e íons de metais de transição tornam a oxihemoglobina mais suscetível à oxidação. Como exemplo, citamos o caso de um antioxidante muito comum em borrachas (N-isopropil-N'-fenil-p-fenilenodiamina) que causa a rápida oxidação e denaturação de hemoglobina purificada (Williamson e colaboradores, 1981). A formação de espécies ativas de oxigênio durante a oxidação de hemoglobina é também sustentada por dados de Brunori e colaboradores (1975) que encontraram um aumento na formação de íon superóxido em talassemias. Neste caso, as cadeias isoladas de hemoglobina são especialmente susceptíveis à oxidação.

A fig. 5.2. mostra a sequência completa de degradação oxidativa de hemoglobina, proposta por Winterbourn e Carrel (1974), culminando com a precipitação intrahemácias da globina e, posteriormente, hemólise. Este quadro explica de forma notável a conexão entre nossos resultados e os dados sobre metahemoglobinemia em moradores de Vila Parisi. Nesta região, há alta concentração de poluentes atmosféricos os quais, via associação ou reação química com a hemoglobina das hemácias, alternariam sua conformação resultando no aumento de velocidade de degradação de oxihemoglobina, com produção excessiva de O_2^- . Este seria o sinal para indução da síntese de SOD (Crappo e Tierney, 1974) acarretando um aumento da concentração eritrocitária de H_2O_2 ($2 O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$). Esse aumento excessivo de peróxido, por sua vez, induziria a biossíntese de GSH-Px em concentrações elevadas (Reddy e Tappel, 1974).

Observou-se também, que os desvios das médias dos dados de dosagens das três enzimas em moradores de Vila Parisi são bem maiores que os desvios das médias das atividades enzimáticas do grupo controle. Tal efeito pode estar relacionado com exposições a poluentes de natureza diferentes, dependendo do local de trabalho ou de residência do indivíduo ou então com respostas metabólicas individuais distintas à toxicidade de espécies ativadas de oxigênio.

Ressaltamos aqui a existência de uma possível relação entre os níveis alterados dessas enzimas protetoras e as recentes comunicações à imprensa do Dr. Reinaldo Azoubel do Departamento de Genética da USP, em Ribeirão Preto, alertando para a existên

FIGURA 5.2 - Degradação de hemoglobina.

cia de vários casos de malformações em recém-nascidos (anencefalia, polidactilia, falta de braços e pernas, coluna vertebral dividida, etc.) de Vila Parisi. De fato, dados de Hoffmann e Meneghini (1979) mostraram que irradiação de células humanas com luz visível ou ultravioleta próximo, na presença de uma solução de riboflavina e triptofano e espécies que geram H_2O_2 como fotoproduto, provoca quebras de fita simples do DNA. Observaram também que tanto células humanas normais (VA-13) como uma linhagem deficiente em reparo de excisão (XP) são sensíveis ao tratamento com baixas concentrações de H_2O_2 (10^{-6} - 10^{-5} M), apresentando uma perda da viabilidade reprodutiva em função da concentração. Este trabalho e outros publicados recentemente sobre lesões químicas no DNA, alertam para séria ameaça ao metabolismo celular envolvendo mutagênese e/ou carcinogênese, caso a produção de espécies excitadas de oxigênio não esteja sob controle fino no organismo.

Concluindo, nossos resultados indicam distúrbios no metabolismo de oxigênio em indivíduos residentes em regiões altamente poluídas, oriundos provavelmente de um aumento na velocidade de autooxidação de hemoglobina. Michelson e colaboradores (1977), já haviam notado diferenças nas atividades de SOD em residentes de Paris, contudo não adiantaram nenhuma explicação para estes resultados.

O fato dos níveis das enzimas reguladoras do metabolismo de oxigênio estarem elevados tanto em casos de indivíduos com distúrbios psíquicos como em casos de residentes em Vila Parisi não estabelece, a princípio, nenhum tipo de correlação entre es

ses dois grupos, uma vez que nos indivíduos sujeitos a altos índices de poluição, os níveis de SOD e GSH-Px elevados podem significar uma adaptação metabólica eficiente para terem vida saudável apesar das condições ambientais em que vivem.

6. S U M Á R I O

A redução univalente de oxigênio molecular nas células produz intermediários altamente reativos tais como o íon radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($HO^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Níveis muito altos ou baixos de tais espécies representam séria ameaça ao metabolismo celular. Diferentes estados patológicos têm sido relacionados com níveis anormais destas espécies em eritrócitos e plaquetas. A proteção biológica contra efeitos tóxicos associados com níveis excessivos de espécies ativadas de oxigênio, tem sido atribuída a três enzimas principais presentes em eritrócitos e outras células: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

Neste trabalho, foram feitas dosagens dessas enzimas protetoras em eritrócitos de indivíduos portadores de porfiria aguda intermitente. Esta doença caracteriza-se por um defeito na biosíntese de heme e clinicamente manifesta-se por dor abdominal intensa, paralisia e distúrbios neuropsíquicos. Foram encontrados nos pacientes em crise aguda atividades elevadas de superóxido dismutase e de glutathione peroxidase enquanto que a atividade de catalase permaneceu normal. Tais resultados apontam a possibilidade de que as manifestações clínicas de IAP estejam relacionadas com toxicidade por oxigênio.

Comparou-se também a atividade destas três enzimas em eritrócitos de residentes na cidade de São Paulo com o de morado-

res de Vila Parisi, conhecida pelo seu altíssimo nível de poluição atmosférica. Os níveis de superóxido dismutase e de glutathiona peroxidase são bem mais elevados (cerca de 1,5 vezes) nos indivíduos residentes em Vila Parisi. A elevação da concentração intracelular destas enzimas pode ser sua resposta ao aumento da taxa de oxidação da oxihemoglobina, a qual é conhecida fonte de íons superóxido. Estes dados demonstram profundas diferenças no metabolismo de O_2 entre esses dois grupos e talvez uma possível adaptação metabólica dos moradores de Vila Parisi aos altos níveis de poluição a que estão expostos.

7. SUMMARY

The univalent reduction of molecular oxygen in cells produces very reactive species such as the superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$), the hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Abnormally high or low concentrations of such species may represent a serious threat to the cellular metabolism. Indeed, several disorders have been associated with abnormal levels of these species in erythrocytes and platelets. The biological protection against toxic effects due to excessive levels of activated species of molecular oxygen has been attributed mainly to three enzymes occurring in erythrocytes and other cells: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase.

In the present work, we report the activities of SOD, GSH-Px and catalase in the erythrocytes of patients with intermittent acute porphyria (IAP), an inborn error in the heme biosynthetic pathway. The clinical manifestations of IAP include abdominal pain and neuropsychiatric symptoms. In patients undergoing acute attack, we found increased levels of SOD and GSH-Px, while that of catalase remains unchanged. These results point to the possibility that the clinical manifestations of IAP are related to oxygen toxicity.

We have also compared the activities of these enzymes in

residents of the city of São Paulo (Brazil) and in subjects living in Vila Parisi (Cubatão, SP, Brazil), a village submitted to high levels of atmospheric pollution. The erythrocyte SOD and GSH-Px levels were found to be ca. 1.5 fold higher in residents of Vila Parisi. These high intracellular enzyme concentrations may reflect a biological defense against an increase in the rate of oxyhemoglobin oxidation, known to be a source of superoxide species. Our results point to important differences between the two populations with respect to the metabolism of oxygen and, perhaps, a metabolic adaptation in the residents of Vila Parisi to the dramatically high levels of atmospheric pollution.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agar, N.S., J. Hingston (1980) Med.J.Aust. 1, 556-557.
- Auclair, C., D. Dhermy e P. Boivin (1981) Bull.europ.Physio-path.resp. 17, 207-212.
- Ballou, D., G. Palmer e V. Massey (1969) Biochim.Biophys.Res. Commun. 36, 898-904.
- Bartoli, G.M., T. Galeotti, G. Palombini, G. Parisi e A. Azzi (1977) Arch.Biochem.Biophys. 184, 276-281.
- Beauchamp, C. e I. Fridovich (1971) Anal.Biochem. 44, 276-287.
- Bechara, E.J.H. e G. Cilento (1971) Biochemistry 10, 1831-1836.
- Beckmann, R. e L. Flohé (1981) Bull.europ.Physiop.resp. 17, 275-286.
- Bonkowsky, H.L., A. Collins, J.M. Doherty e D.P. Tschudy (1973) Biochim.Biophys.Acta 320, 561-576.
- Boveris, A., N. Oshino e B. Chance (1972) Biochem.J. 128, 617-630.
- Boveris, A., E. Cadenas e A.O.M. Stoppani (1973) Biochem.J. 134, 707-716.
- Boveris, A. e E. Cadenas (1975) FEBS Lett. 54, 311-314.
- Bozzi, A., I. Mavelli, A. Finazzi, R. Strom, A.M. Woly, B. Mondovi e G. Rotilio (1976) Mol.Cell.Biochem. 10, 11-16.

- Brunori, M., G. Falcioni, E. Fioretti, B. Giardina, G. Rotilio
(1975) Europ.J.Biochem. 53, 99-104.
- Buettner, G.R., L.W. Oberley, S.W.H.C. Leuthauser (1978)
Photochem.Photobiol. 21, 693-695.
- Burri, B.J., S.G. Chan, A.J. Berry e S.K. Yarnell (1980) Clin.
Chim.Acta 105, 249-255.
- Carrell, R.W., C.C. Winterbourn e E.A. Rachmilewitz (1975)
Brit.J.Haematol. 30, 259-264.
- Chance, B., H. Sies e A. Boveris (1979) Physiol.Reviews 59,
527-605.
- Chow, C.K. e A.L. Tappel (1972) Lipids 7, 518-524.
- Christophersen, B.O. (1969) Biochem.Biophys.Acta 176, 463-
470.
- Cilento, G. (1980) Acc.Chem.Rev. 13, 225-230.
- Cohen, G. e P. Hochstein (1963) Biochemistry 2, 1420-1428.
- Cohen, G. e R.E. Heikkila (1977) em "Superoxide and Superoxide
Dismutases" eds. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich,
Academic Press, New York, pp. 351-365.
- Cotton, M.L. e H.B. Dunford (1973) Can.J.Chem. 51, 582-587.
- Crapo, J.D. e D.F. Tierney (1974) Am.J.Physiol. 226, 1401-1407.
- Del Villano, B.C., S.I. Miller, L.P. Schacter e J.A. Tischfield
(1980) Science 207, 991-993.
- Diliberto Jr., E.J. e S. Kaufman (1977) em "Superoxide and
Superoxide Dismutases", eds. A.M. Michelson, J.M. McCord
e I. Fridovich, Academic Press, New York, pp. 407-408.
- Dionisi, O., T. Galeotti, T. Terranova e A. Azzi (1975) Biochim.
Biophys.Acta 403, 292-301.

- Drabkin, D.L. e J.H. Austin (1935) J.Biol.Chem. 112, 51-57.
- Drew, H.D.K. e F.H. Perman (1937) J.Chem.Soc. 26, 586-592.
- Dunford, H.B. e J.S. Stillman (1976) Coord.Chem.Rev. 19, 187-251.
- Durán, N., Y. Makita e L.H. Innocentini (1979) Biochem.Biophys. Res. Commun. 88, 642-648.
- Emerit, J., J. Loeper, G. Chomette (1981) Bull.europ.Physio-path.resp. 17(suppl.), 287-288.
- Estabrook, R.W., A.G. Hildebrandt, J. Baron, K.J. Netter e K. Leibman (1971) Biochem.Biophys.Res.Comm. 42, 132-139.
- Estabrook, R.W. e J. Werringloer (1977) em "Tissue Hypoxia and Ischemia", ed. M. Reivich, R. Coburn, S. Lahiri e B. Chance, Plenum, New York, pp. 19-35.
- Feigelson, P. e F.O. Brady (1974) em "Molecular Mechanism of Oxygen Activation", ed. O. Hayaishi, Academic Press, New York, pp. 87-133.
- Flashner, M.S. e V. Massey (1974) em "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation", ed. O. Hayaishi, Academic Press, New York, pp. 245-280.
- Flohé, L. (1979) em "Oxygen Free Radicals and Tissue Damage", ed. Ciba Foundation, New York, pp. 95-113.
- Flohé, L. e W. Schlegel (1971) Physiol.Chem. 352, 1401-1410.
- Flohé, L. e R. Zimmernann (1974) em "Glutathione", eds. L. Flohé, H.Ch. Benöhr, H. Sies, H.D. Waller e A. Wendel, Georg Thieme, Stuttgart, pp. 245-260.

- Fridovich, I. (1972) Acc.Chem.Res. 5, 321-326.
- Fridovich, I. (1974) em "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation", ed. O. Hayaishi, Academic Press, New York, pp. 453-477.
- Fridovich, I. (1975) Annu.Rev.Biochem. 44, 147-159.
- Fridovich, I. (1977) em "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen", ed. O. Hayaishi e K. Asada, University Park Press, Tokyo, pp. 171-181.
- Fridovich, I. (1979) em "Advances in Inorganic Biochemistry", eds. G.L. Eichhorn e L.G. Marzili, Elsevier/North Holland, New York, pp. 67-90.
- Foote, C.S. (1976) em "Free Radicals in Biology", ed. W.A. Pryor, Academic Press, New York, vol. II, pp. 85-133.
- Foote, C.S., F.C. Shook, R.A. Abakerli (1980) J.Am.Chem.Soc. 102, 2503-2504.
- Gerli, G.C., L. Beretta, M. Bianchi, A. Pellegatte e A. Agostoni (1980) Scand.J.Haematol. 25(1), 87-92.
- Goldgerb, B. e A. Stern (1976) J.Biol.Chem. 251, 6468-6470.
- Goldberg, A., M.J. Brodie e M.R. Moore (1978) em "Porphyrin Metabolism and the Porphyrrias" ed. Bodley-Scott, R., Oxford University Press, pp. 420-425.
- Goldstein, I.M., D. Ross, H.B. Kaplan e G. Weissmann (1975) J.Chim.Invest. 56, 1155-1163.
- Golse, B., P. Debray-Ritzen, P. Durosay, K. Puget e A.M. Michel-son (1978) Rev.Neurol. 134, 699-705.
- Gregory, E.M. e I. Fridovich (1973) J.Bacteriol. 114, 1193-1197.

- Gregory, E.M., S.A. Gosciniak e I. Fridovich (1974) J.Bacteriol. 117, 456-460.
- Gryglewski, R.J., S. Bunting, S. Moncada, R.J. Flower e J.R. Vane (1976) Prostaglandins 12, 685-713.
- Guiraud, H.J. e C.S. Foote (1976) J.Am.Chem.Soc. 98, 1984-1986.
- Halliwell, B. (1978) em "Age Pigments", ed. R.S. Sohal, Elsevier/North-Holland, New York.
- Halliwell, B. (1978a) FEBS Lett. 92, 321-326.
- Halliwell, B. (1978b) Cell.Biol.Int.Rep. 2, 113-128.
- Halliwell, B. (1981) Bull.europ.Physiopath.resp. 17, 21-28.
- Harmn, D. (1971) J.Geront. 26, 451-457.
- Hartz, J.W., S. Funakoshi e H.F. Deutsch (1973) Clin.Chim. Acta 46, 125-132.
- Hassan, H.M. e I. Fridovich (1977) J.Bacteriol. 129, 1574-1583.
- Hildebrandt, A.G. e I. Roots (1975) Arch.Biochem.Biophys. 171, 385-397.
- Hinckle, P.C., R.A. Britow, E. Racker e B. Chance (1967) J. Biol.Chem. 242, 5169-5173.
- Hirata, F. e O. Hayaishi (1972) Biochem.Biophys.Res.Comm. 47, 1112-1119.
- Hirata, F. e O. Hayaishi (1977) em "Superoxide and Superoxide Dismutases", eds. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, Academic Press, New York, pp. 395-406.

- Hoffmann, M.E. e R. Meneghini (1979) Photochem.Photobiol. 29, 299-303.
- Jacobs, M.M., B. Jansson e A.C. Griffin (1977) Cancer Lett. 2, 133-137.
- Jensen, P.K. (1966) Biochem.Biophys.Acta 122, 157-166.
- Johnston, R.B. e J.E. Lehmeyer (1977) J.Clin.Invest. 57, 836-841.
- Kearns, D.R. (1971) Chem.Rev. 71, 395-427.
- Lazarow, P.B. e C. De Duve (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 2043-2046.
- Little, C. e P.J. O'Brien (1968) Biochem.Biophys.Res.Comm. 31, 145-150.
- Liu, T.Z., J.T. Shen e W.F. Ganong (1974) Proc.Soc.Exp.Bio Med. 146, 37.
- Lynch, R.E. e B.C. Cole (1980) Biochem.Biophys.Res.Comm. 96, 98-105.
- Maral, J., K. Punget e A.M. Michelson (1977) Biochem.Biophys. Res.Comm. 77, 1525-1535.
- Marver, H.S. e R.C. Schmid (1972) em "The Metabolic Basis of Inherited Disease", eds. J.B. Stanbury, J.B. Wyngoarden e D.S. Frederickson, McGraw-Hill, New York, p. 1057.
- Massey, V., S. Strickland, S. Mayhew, L. Howell, P. Engel, R. Matthews, M. Schuman e P. Sullivan (1969) Biochem.Biophys. Res.Comm. 36, 891-897.
- McCord, J.M. e I. Fridovich (1968) J.Biol.Chem. 243, 5753-5760.

- McCord, J.M. e I. Fridovich (1969) J.Biol.Chem. 25, 6049-6055.
- McCord, J.M. e E.D. Day (1978) FEBS Lett. 86, 139-142.
- Meyer, U.A. e R. Schmid (1974) em "Brain Dysfunction in Metabolic Disorders", ed. F. Plum, vol. 53, Raven Press, New York, pp. 211-224.
- Michelson, A.M. (1977) em "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen", ed. O. Hayaishi e K. Asada, University Park Press, Tokyo, pp. 155-168.
- Michelson, A.M., K. Puget, P. Durosay e J.C. Bouneau (1977), em "Superoxide and Superoxide Dismutases", ed. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, Academic Press Inc., London, pp. 467-499.
- Miller, R.W. e U. Rapp (1973) J.Biol.Chem. 248, 6084-6090.
- Mishin, V., A. Pokrovsky e V.V. Lyabovich (1976) Biochem.J. 154, 307-310.
- Misra, H.P. e I. Fridovich (1972) J.Biol.Chem. 247, 6960-6962.
- Miyagi K., R. Cardinal, I. Bossinmaier e C.J. Watson (1971) J.Lab.clin.Med. 78, 683-695.
- Moore, M.R., E.L. Kenneth e A. Goldberg (1980) Int.J.Biochem. 12, 941-946.
- Morrison, M., P.Z. Allen, J. Bright and W. Jayasinghe (1965) Arch.Biochem.Biophys. 111, 126-133.
- Morroka, Y., P.J. Chung, H. Arakawa e T. Ikawa (1976) Chem. Lett. 1293-1296.
- Nicholls, P. e G.R. Schombaum (1963) em "The Enzymes", ed. P.D. Boyer, H. Lardy e K. Myrback, vol. 8, 2nd., p. 147.

- Nishinaga, A. (1977) em "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen", ed. O. Hayaishi e K. Asada, University Park Press, Tokyo, pp. 13-27.
- Niwa, T., H. Yamaguchi e K. Yana (1977) em "Biochemical Medical Aspects of Active Oxygen", ed. O. Hayaishi e K. Asada, University Park Press, Tokyo, pp. 209-222.
- Norrod, P. e S.A. Morse (1979) Biochem.Biophys.Res.Comm. 101, 1026-1031.
- Oberley, L.W. e R.G. Buettner (1979) Cancer Research 39, 1141-1149.
- Okahata, S., Y. Nishi, S. Hatano, Y. Kobayashi e T. Usui (1980) Eur.J.Pediatr. 134, 121-124.
- Omaye, S.T., S.L. Taylor, J.W. Forstrom e A.L. Tappel (1975) Fed.Proc. 34, 538.
- Orrenios, S. e L. Ernster (1974) em "Molecular Mechanisms in Oxygen Activation", ed. O. Hayaishi, New York Academic, pp. 215-244.
- Oshino, N. e B. Chance (1977) em "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen", ed. O. Hayaishi e K. Asada, University Park Press, Tokyo, pp. 191-204.
- Packer, L. e K. Fuehr (1970) Lab.Invest. 23, 86-92.
- Packer, L. e J.R. Smith (1974) Proc.Nat.Acad.Sci., Wash. 71, 4763-4767.
- Reddy, K. e A.L. Tappel (1974) J.Nutr. 104, 1069-1078.
- Rigo, A., R. Stevanato, A. Finazzi-Agro e G. Rotilio (1977) FEBS Lett. 80, 130-132.

- Rister, M., K. Bauermeister, U. Gravert e E. Gladtko (1979)
Eur.J.Pediatr. 130, 127-136.
- Ross, D. e R.S. Weening (1979) em "Oxygen Free Radicals and
 Tissue Damage", ed. Ciba Foundation, New York, pp. 225-254.
- Rowland, L.P. (1976) Arch.Neurol. 33, 315-321.
- Salin, M.L. e J.M. McCord (1974) J.Clin.Invest. 54, 1005-1009.
- Saunders, B.C., A.G. Holmes-Siedle e B.P. Stark (1964) "Per-
 oxidase", Washington, DC: Butterworths.
- Schombaum, G.R. e B. Chance (1976) em "The Enzymes", 2a.ed.,
 ed. P.D. Boyer, Academic Press, New York, pp. 363-408.
- Schrauzer, G.N., D.A. White e C.J. Schneider (1977) Bioinorg.
Chem. 7, 23-34.
- Shamberger, R.J. (1976) em "Proceedings of the Symposium on
 Selenium-Tellurium in the Environment", ed. Industrial Health
 Foundation, Inc., Pittsburgh, pp. 253-267.
- Sies, H. (1974) Angew.Chem.Int.Ed.Engl. 13, 706-718.
- Strand, L.J., U.A. Meyer, B.F. Felsher, A.G. Redicker e H.S.
 Marver (1972) J.Clin.Invest. 51, 2530-2536.
- Sutton, H.C., P.B. Roberto e C.C. Winterbourn (1976) Biochem.
J. 155, 503-510.
- Tschudy, D.P., M. Valsamis e C.R. Magnusseu (1975) Ann.Internal
Med. 83, 851-864.
- Tyler, D.D. (1975) Biochem.J. 147, 493-504.
- Ueda, K. e M. Ogata (1978) Acta Med. Okayama 32, 1393-1397.
- Van Den Brenk, H.A.S. e D. Jamieson (1964) Biochem.Pharmacol.
13, 165-182.

- Vanneste, W.H. e A. Zuberkuhler (1974) em "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation", ed. Osamu Hayaishi, Academic Press, New York, pp. 371-399.
- Xifra, E.A.W., A.M.C. Batlle, A.M. Stella e S. Malamud (1980) Int.J.Biochem. 12, 819-822.
- Yamazaki, I. (1974) em "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation", ed. Osamu Hayaishi, Academic Press, New York, pp. 535-554.
- Williamson, D., C.C. Winterbourn, W.H. Swallow e A.W. Missen (1981) Hemoglobin 5, 73-84.
- Wilson, T. (1976) em "Chemical Kinetics", série 2, ed. D.R. Herschbach, M.T.P. Int.Rev.Sci., Butterworth, London, p. 265.
- Winterbourn, C.C. e R.W. Carrel (1974) J.Clin.Invest. 54, 678-689.
- Wood, J.D. e G.F. Perkins (1970) Aerosp.Med. 41, 869-872.
- Zakowski, J.J. e A.L. Tappel (1978) Biochim.Biophys.Acta 526, 65-76.