UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ANTIOXIDANTES
NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

CLÁUDIA SEELY ROCCO

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Dr. Hélio Vannucchi

São Paulo

2002

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central Campus USP -
Ribeirão Preto

Rocco, Cláudia Seely
Peroxidação lipídica e antioxidantes no Lúpus
Eritematoso Sistêmico. São Paulo, 2002.
131 p.: il.; 30cm.

Tese de doutorado apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de São Paulo/USP. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental. Área: Nutrição Experimental.

Orientador: Vannucchi, Prof. Dr. Hélio.

1. Peroxidação lipídica; 2. Antioxidantes; 3. Lúpus Eritematoso
Sistêmico.

CLÁUDIA SEELY ROCCO

**PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ANTIOXIDANTES
NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor

**Prof. Dr. Hélio Vannucchi
Orientador/Presidente**

**Prof. Dr. Paulo Louzada Jr.
1º. examinador**

**Prof. Dr. Daniel Ferreira da Cunha
2º. examinador**

**Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
3º. examinador**

**Profa. Dra. Sílvia Maria F. Cozzolino
4º. examinador**

São Paulo, 26 de março de 2002.

"A OCASIÃO É FUGAZ,
A ARTE É LONGA,
A EXPERIÊNCIA ENGANADORA,
E O JULGAMENTO DIFÍCIL".

(Hipócrates)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Alcy e Brigitte, e ao meu irmão Renato, companheiros amorosos de todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hélio Vannucchi, pela orientação, estímulo e apoio.

Ao Prof. Dr. Paulo Louzada Jr., pelos ensinamentos e inestimável contribuição na condução deste trabalho.

À Família do Sr. Arnaldo Meirelles, pela acolhida e carinho.

Aos pacientes e voluntários participantes do estudo, pela valiosa colaboração.

À Universidade Federal do Paraná e aos professores do Departamento de Nutrição, pela oportunidade.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa PICDT e Programa de Bolsa Sanduíche, pela concessão da bolsa de estudo.

À Mônica Meirelles e ao Alceu Afonso Jordão Jr., pela amizade e apoio técnico.

Às amigas Márcia Elena, Márcia, Paula, Ellen, Fernanda, Andrea, Maria do Rosário, Maria Sílvia, Áurea, Sandra, Maria Aparecida e Heloisa;

Aos residentes e equipe de enfermagem da Unidade Metabólica, Unidade de Imunologia e Ambulatório de Colagenoses do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao Prof. Gérson Muccilo, pela orientação na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno e à Profa. Dra. Sílvia Maria F. Cozzolino, pelo incentivo e pela atenção dispensada;

À Profa. Dra. Daisy M. F. Salvadori da UNESP de Botucatu, pela colaboração na padronização do Teste do Cometa;

Às secretárias Márcia Gaioli (Depto. de Clínica Médica - FMRP - USP); Ângela Oliveira e Isabel Alves (Depto. de Alimentos e Nutrição Experimental - FCF - USP); Benedita Oliveira, Elayne Ychico e ao secretário Jorge Lima (Secretaria da Pós-Graduação - FCF - USP).

A todos que, embora não nomeados individualmente, nos apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Dano oxidativo	2
1.2	Defesa antioxidante	4
1.2.1	Sistemas enzimáticos de defesa antioxidante	7
1.2.2	Sistemas não-enzimáticos de defesa antioxidante	9
1.3	Antioxidantes e doenças inflamatórias auto-imunes	11
2	OBJETIVO GERAL	17
2.1	Objetivos específicos	17
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	19
3.1	Casuística	19
3.1.1	Seleção dos pacientes	19
3.1.2	Caracterização da população	20
3.1.2.1	Formação dos grupos	20
3.1.2.2	Consumo alimentar	21
3.1.3	Procedimento	22
3.1.4	Avaliação nutricional e clínica	22
3.1.4.1	Avaliação nutricional	22
3.1.4.2	Avaliação clínica	24
3.2	Métodos	24
3.2.1	Peroxidação lipídica (oxidação de lipídios)	25
3.2.2	Grupo carbonila (oxidação de proteínas)	26
3.2.3	Teste do Cometa (lesão de DNA)	26
3.2.4	Enzimas antioxidantes	31

3.2.4.1	Glutationa peroxidase	31
3.2.4.2	Superóxido dismutase	31
3.2.5	Vitaminas antioxidantes	32
3.2.5.1	Alfa-tocoferol	32
3.2.5.2	Ácido ascórbico	33
3.2.6	Colesterol	33
3.3	Análise dos dados	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Caracterização individual e clínica da doença	36
4.1.1	Medida de atividade da doença segundo o SLEDAI	38
4.2	Marcadores de oxidação de lipídios, de proteínas e lesão de DNA	42
4.2.1	Peroxidação lipídica	46
4.2.2	Marcador da oxidação de proteínas	48
4.2.3	Lesão de DNA	48
4.3	Antioxidantes	48
4.3.1	Antioxidantes enzimáticos	50
4.3.2	Antioxidantes não-enzimáticos	50
4.4	Excreção urinária de α -tocoferol	53
4.5	Status do processo inflamatório	56
4.6	Terapêutica medicamentosa	58
4.7	Comprometimento renal	67
5	DISCUSSÃO	72
5.1	Caracterização individual e clínica da doença	73
5.1.1	Idade e sexo	73
5.1.2	Índice de massa corporal (IMC)	73
5.1.3	SLEDAI	75
5.1.4	Complemento	78
5.1.5	Proteinúria	79
5.2	Dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA	79
5.2.1	Peroxidação lipídica	79
5.2.2	Oxidação de proteína	81
5.2.3	Lesão de DNA	82

5.3 Defesa antioxidante	85
5.3.1 Enzimas antioxidantes	85
5.3.2 Vitaminas antioxidantes	88
5.3.2.1 Vitamina C	88
5.3.2.2 Alfa-tocoferol plasmático	90
5.4 Excreção urinária de α -tocoferol	92
5.5 Efeito da terapia medicamentosa	98
5.6 Comprometimento renal	101
6 CONCLUSÕES	104
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
RESUMO	119
SUMMARY	121
ANEXOS	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -TOCOF.	Alfa-tocoferol
C/ ANTIIN	Com antiinflamatório
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamínico tetracético
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
GSH-Px	Glutathione peroxidase
Hg	Hemoglobina
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MDA	Malondialdeído
N/Renal ou N/R	Não-renal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
ns	não significativa
PBS	Tampão fosfato
Ptna	Proteína
R	Renal
S/ ANTIIN	Sem antiinflamatório
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SOD	Superóxido dismutase
U	Unidade (s)
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VIT C	Vitamina C

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sistema primário e secundário de defesa antioxidante	6
Figura 2 -	Estrutura do α -tocoferol	10
Figura 3 -	Radicais livres e inflamação	11
Figura 4 -	Representação da cabeça e da cauda do cometa avaliadas pelo Teste do Cometa	29
Figura 5 -	Esquema do comportamento das fitas de DNA em relação às etapas analíticas do Teste do Cometa	30
Figura 6 -	Dispersão dos valores de SLEDAI e idade em anos para o conjunto de pacientes com LES	41
Figura 7 -	Frequência de valores para o momento da cauda para os indivíduos controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença	44
Figura 8 -	Fotomicrografia de leucócito humano mostrando a migração de DNA induzida por peróxido de hidrogênio (magnificação de 40 x)	45
Figura 9 -	Dispersão dos valores de MDA e proteinúria para o Grupo Doença Ativa	47

Figura 10 -	Dispersão dos valores de SLEDAI e vitamina C para o conjunto de pacientes com LES	52
Figura 11 -	Dispersão dos valores de excreção urinária de α -tocoferol e proteinúria para o conjunto de pacientes com LES	54
Figura 12 -	Dispersão dos valores de excreção urinária de α -tocoferol e SOD para o Grupo Doença Ativa	55
Figura 13 -	Terapêutica medicamentosa, especialmente com prednisona, para os pacientes com LES em relação à atividade da doença	59
Figura 14 -	Frequência de uso associado de outros medicamentos no tratamento do LES de acordo com a atividade da doença	62
Figura 15 -	Frequência dos sistemas orgânicos afetados pelo LES de acordo com o SLEDAI	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Medianas e valores mínimos e máximos para idade, IMC, proteínas de fase aguda (C3 e C4) e proteinúria para os indivíduos controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença	37
TABELA 2 -	Frequência dos elementos de SLEDAI em relação à atividade da doença para o conjunto de pacientes com LES	39
TABELA 3 -	Medianas e valores mínimos e máximos para malondialdeído (MDA) e grupo carbonila para os indivíduos controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença	43
TABELA 4 -	Medianas e valores mínimos e máximos para superóxido dismutase, glutathione peroxidase, vitamina C e α -tocoferol para os indivíduos controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença	49
TABELA 5 -	Mediana e valores mínimos e máximos de excreção urinária de α -tocoferol no período de 24 horas para os indivíduos controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença	53
TABELA 6 -	Mediana dos resultados para os parâmetros estudados de acordo com o <i>status</i> do processo inflamatório	57

TABELA 7 -	Terapêutica medicamentosa e comprometimento renal para os pacientes com LES de acordo com a atividade da doença	60
TABELA 8 -	Valores das medianas para os dados analisados quanto à terapêutica medicamentosa (sem ou com antiinflamatório esteróide) para o Grupo Doença Ativa	64
TABELA 9 -	Valores das medianas para os dados analisados quanto à terapêutica medicamentosa (sem ou com antiinflamatório esteróide) para o Grupo Doença Inativa	66
TABELA 10 -	Valores das medianas para os dados analisados quanto ao comprometimento renal (renal ou não-renal) para o Grupo Doença Ativa	68
TABELA 11 -	Valores das medianas para os dados analisados quanto ao comprometimento renal (renal ou não-renal) para o Grupo Doença Inativa	70

1 INTRODUÇÃO

Dados recentes de investigação experimental e observações clínicas têm demonstrado que os radicais livres estão relacionados aos processos fisiológicos e mórbidos em humanos (Jiang & Chen, 1992). Entre os mecanismos biológicos, para os quais os processos oxidativos são importantes, destacam-se a morte programada da célula (apoptose), fagocitose, quimiotaxia das células imunes e sinalização para formação de trombos no processo de coagulação sangüínea (Jacob & Burri, 1996). Paralelamente, várias patologias, incluindo o carcinoma (Collins, 1998), a aterogênese (Reaven & Witztum, 1995), o acidente vascular cerebral isquêmico (Polidori et al., 1998), a hepatite, a inflamação, a injúria por radiação, e a artrite reumatóide (Gambhir et al., 1997), podem ser decorrentes, direta ou indiretamente, do dano oxidativo causado por radicais livres gerados no organismo.

Radical livre é definido por Gutteridge & Halliwell (1994a) como qualquer espécie capaz de existência independente por conter um ou mais elétrons não pareados. O radical livre varia em relação a sua reatividade química, podendo apresentar-se na forma de átomo ou molécula. Este último será assim designado se um ou mais dos átomos presentes apresentarem elétrons não pareados. O termo “espécies reativas de oxigênio” (ERO's) abrange:

1. radicais contendo oxigênio (Karlsson, 1997): [superóxido ($O_2^{\bullet-}$); radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$); óxido nítrico ($NO^{\bullet}$); peroxila ($ROO^{\bullet}$)]; e
2. substâncias não radicalares derivadas de oxigênio [peróxido de hidrogênio (H_2O_2); ozônio (O_3); ácido hipocloroso ($HOCl$); e oxigênio singleto (1O_2)] (Aruoma, 1994).

1.1 Dano oxidativo

As ERO's podem causar dano oxidativo em várias macromoléculas biológicas. As proteínas podem também sofrer dano pelas ERO's. Como resultado pode ser afetada a função de receptores, enzimas, transporte de proteínas, etc., possivelmente gerando novos antígenos que provocam resposta imune (Frei, 1994). O teste do grupo carbonila protéico é empregado para análise da modificação oxidativa de proteínas (Chevion et al., 2000), e está demonstrado que a concentração de grupos carbonila aumenta em decorrência do dano oxidativo. A idade e doenças associadas com a idade e/ou envelhecimento prematuro igualmente contribuem para o incremento (Frei & Mccall, 2001).

O dano oxidativo secundário pode ocorrer a outras moléculas como por exemplo inativação de enzimas de reparo do DNA (Diplock et al., 1998). Lesão oxidativa do DNA ocorre sob condições metabólicas normais, o que favorece a formação de mais que 20 diferentes lesões oxidativas, muitas das quais são conhecidas por serem mutagênicas. Existem, no entanto, enzimas específicas, capazes de reparar o DNA e, por conseguinte, remover essas lesões. Contudo, os sistemas de reparo não são perfeitos, ainda que removam 99 % das lesões. A porcentagem que remanesce (1%), pode elevar-se ao longo do tempo e acumular-se. Portanto, o dano oxidativo de DNA e as mutações acumulam com a idade e outras doenças degenerativas (Frei, 1994).

A estimativa do dano de simples fita de DNA pode ser analisada em linfócitos ou outras células individuais por técnica de eletroforese. Ou seja, fitas lesadas de DNA quando submetidas a um campo elétrico são

susceptíveis a distensão demonstrando uma forma que se assemelha à cauda de cometa. Em razão disso, as células podem ser avaliadas e empregadas como um índice da lesão. Este método, conhecido como Teste do Cometa, é uma ferramenta útil na análise de células individuais especialmente quando enzimas de reparo são empregadas paralelamente (Frei & McCall, 2001).

As membranas celulares consistem de uma bicamada de fosfolipídios entre as quais proteínas estão embebidas e apresentam ações específicas. Para exercerem suas funções propriamente, as membranas precisam ser fluidas (isto é, os seus constituintes devem ter a possibilidade de moverem-se livremente), sendo essa característica determinada, em grande parte, pela presença de cadeias laterais de ácidos graxos poliinsaturados na membrana lipídica (Pryor, 1994). Esses ácidos graxos são muito susceptíveis ao ataque dos radicais livres, que por sua vez podem iniciar a peroxidação lipídica (Zwart et al., 1999; Niki, 2000) e comprometer a membrana diretamente, alterando sua fluidez, permeabilidade e integridade, ou atingir o DNA e outras moléculas pela perpetuação das reações em cadeia e formação de produtos derivados (Oldham, 1998; Zwart et al., 1999), incluindo etano, pentano, propano, malondialdeído (MDA) (Chance et al. 1979) e vários outros (Fridovich, 1999).

O malondialdeído é um aldeído de baixo peso molecular, resultante tanto da oxigenação do ácido araquidônico como da degradação lipídica oxidativa (Janero, 1990) e representa um índice de avaliação da peroxidação lipídica (Buege & Aust, 1978) pela reação com o ácido tiobarbitúrico (ATB). A análise desse elemento tem sido amplamente empregada por muitos anos, sendo um dos métodos mais comumente utilizados no monitoramento de peroxidação em amostras biológicas (Templar et al., 1999). A determinação da concentração do malondialdeído no plasma é a ferramenta clínica para diagnosticar a presença da formação de radical ou processo inflamatório e estimar sua magnitude (Karlson, 1999).

Há três fases que caracterizam a auto-oxidação. A primeira, chamada fase de iniciação, um átomo de hidrogênio ($H^\bullet$) é seqüestrado do grupo metileno (CH_2) entre duas duplas ligações do ácido graxo poliinsaturado (LH) produzindo um radical lipídico ($L^\bullet$) (Frei, 1994). A fase seguinte, de propagação, tem como primeira etapa a conversão dos radicais de lipídio contendo carbono em radicais peroxila ($LOO^\bullet$) como resultado da reação com oxigênio molecular dissolvido. Essa fase cresce à medida que aumenta a concentração de substrato peroxidável e a reatividade do radical peroxila em relação ao substrato (Burton & Ingold, 1989). O radical peroxila, por sua vez, pode reagir com uma cadeia lateral adjacente de ácido graxo poliinsaturado por abstração de átomo de hidrogênio (Burton & Ingold, 1989). O novo radical de lipídio segue o sentido da reação de iniciação, produzindo outro radical peroxila. Assim, a reação em cadeia tem continuidade através das reações de propagação gerando grande número de ciclos até o seu decréscimo em decorrência do próprio aumento da concentração de radicais e reatividade dos radicais peroxila. A reação de terminação é caracterizada pela formação de produtos não-radicalares (Burton & Ingold, 1989).

Os radicais livres estão invariavelmente envolvidos na peroxidação lipídica e quando um desses reage com uma espécie não-radicalar, outro radical livre é gerado dando início à reação em cadeia (Pryor, 1994).

Para evitar o dano causado pelas ERO's, múltiplos sistemas de defesa, coletivamente chamados antioxidantes, estão presentes no soro humano assim como nos eritrócitos (Gambhir, 1997).

1.2 Defesa antioxidante

A maior parte das membranas biológicas, composta de ácidos poliinsaturados altamente peroxidáveis, é extremamente susceptível ao dano oxidativo grave. Uma série de condições variadas está associada ou a um sistema de defesa antioxidante inadequado ou a um excesso de geração de radicais livres (Rock et al., 1996). O termo estresse oxidativo é muitas vezes

utilizado para fazer referência a essa condição. Quando o estresse oxidativo é leve, os tecidos muitas vezes respondem através de defesa antioxidante extra. No entanto, estresse oxidativo grave pode causar injúria celular e morte. A morte celular induzida pelo radical livre pode seguir como necrose ou apoptose (Halliwell, 1994). A defesa ideal é a completa supressão da reação dos radicais livres. Essa forma de inibição é função de antioxidantes primários ou preventivos, que agem pela remoção de precursores de radicais livres ou por inativação dos catalisadores (Burton & Ingold, 1989).

Os antioxidantes podem remover ERO's antes que elas possam causar dano às várias biomoléculas, ou prevenir o dano oxidativo de se disseminar pela interrupção da reação em cadeia da peroxidação lipídica. Os sistemas de defesa antioxidante no organismo humano consistem de múltiplos elementos de proteção em diferentes sítios e contra diferentes tipos de ERO's, conforme representado pela Figura 1 (Frei, 1994).

Figura 1 - Sistemas primário e secundário de defesa antioxidante (Adaptado de Kehrer & Smith, 1994)

Segundo Halliwell et al. (1992), antioxidante é “qualquer substância que, quando presente em pequena concentração comparada com o substrato oxidável, significativamente retarda ou inibe a oxidação do substrato”. O termo “substrato oxidável” inclui quase tudo encontrado em alimentos e em tecidos vivos como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (Halliwell et al., 1995).

A importância dos antioxidantes *in vivo* depende de como, onde e quais espécies reativas de oxigênio são geradas. Deve-se considerar ainda que é possível para um antioxidante proteger em um sistema ou, ao contrário, falhar na sua proteção, ou ainda, causar dano em outros. Inibidores da peroxidação lipídica podem não proteger do dano outros alvos como DNA e proteína e, algumas vezes, podem agravá-lo (Halliwell et al., 1995).

A defesa das células envolve sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. (Diplock et al. 1998).

1.2.1 Sistemas enzimáticos de defesa antioxidante

As enzimas glutathione peroxidase (GSH-Px) (EC 1.11.1.9) e superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) aparentemente residem na parte aquosa da célula e representam a primeira linha de defesa (Gutteridge & Halliwell, 1994b).

A SOD contém cobre e ferro, metais essenciais para suas funções catalíticas que, quando livres, favorecem a promoção do dano oxidativo. Ainda assim, o organismo necessita deles não apenas pela função de transporte de O_2 , metabolismo e respiração mas também porque participam dos sistemas de defesa antioxidante (Gutteridge & Halliwell, 1994b).

A enzima SOD, reconhecida por sua ação antiinflamatória (McCord, 1986), dismuta duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$ (Aruoma 1994) por ciclo de reação, isto é, oxida uma molécula de $O_2^{\bullet-}$ a O_2 e, com o elétron liberado durante esse processo de oxidação, reduz uma segunda molécula de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . (Frei, 1994).

Uma vez que o desdobramento de $O_2^{\bullet-}$ forma H_2O_2 e que a SOD catalisa essa reação, o acúmulo de H_2O_2 , poderá favorecer a inativação da enzima. Além disso, a possibilidade de migração de H_2O_2 de seus sítios de formação e o contato com íons de ferro e cobre podem favorecer a formação de radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) (Gutteridge & Halliwell, 1994a). Assim sendo, o excesso de SOD em relação à atividade de enzimas de metabolização de H_2O_2 pode determinar dano celular (Gutteridge & Halliwell, 1994a). Portanto, a enzima necessita trabalhar em conjunto com outras que possuem a capacidade de destruir H_2O_2 (Gutteridge & Halliwell, 1994a).

Há 3 tipos de SODs: uma SOD contendo cobre e zinco no citosol das células e outras organelas, outra SOD contendo manganês, que está localizada na matriz mitocondrial, e a terceira, no espaço extracelular - SOD extracelular (SOD-EC) (Fridovich, 1999). As concentrações das três enzimas são muito baixas - há traços de Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, e SOD extracelular (EC-SOD), ainda que a lesão tecidual possa liberar enzimas antioxidantes das células destruídas, aumentando seus níveis nos fluidos

extracelulares e auxiliando a diminuição das ações pró-oxidantes gerais da ruptura da célula (Gutteridge & Halliwell, 1994a).

Os tecidos humanos contêm glutathione peroxidase como uma de suas maiores enzimas removedoras de peróxidos (Gutteridge & Halliwell, 1994b). A enzima está presente no citosol das células dos mamíferos e também na mitocôndria, estando localizada de forma similar à SOD. Isto sugere que a glutathione peroxidase, enzima cuja ação catalítica depende de selênio, é a principal enzima que transaciona com H_2O_2 produzido pela Cu,Zn-SOD no citosol e Mn-SOD na mitocôndria (Bendich, 1990; Halliwell, 1994) e a remoção de H_2O_2 se dá a partir de glutathione reduzida (GSH), formando glutathione oxidada (GSSG) e água (Gutteridge & Halliwell, 1994b), conforme a reação 4:

O efeito da ação de antioxidantes endógenos e outros agentes sobre o dano de DNA é bastante variável. Nesse sentido, a SOD provavelmente não está relacionada aos efeitos sobre o dano de DNA gerados por radicais de oxigênio e é pouco provável que a enzima seja capaz de penetrar o núcleo onde as reações críticas aconteçam (Anderson et al., 1994).

Uma vez que as defesas antioxidantes não são completamente efetivas, enzimas de reparo existem e sua ação consiste em destruir danos causados por radicais livres sobre proteínas, remover ácidos graxos oxidados de membranas e reparar dano de radical livre sobre o DNA. Todas essas defesas são intracelulares. Outras defesas antioxidantes são extracelulares (transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, albumina (Halliwell, 1994).

1.2.2 Sistemas não-enzimáticos de defesa antioxidante

Fazem parte do grupo de sistemas não-enzimáticos: compostos endógenos de baixo peso molecular, lipossolúveis e hidrossolúveis (ubiquinol 10, urato, bilirrubina) (Frei, 1994), e antioxidantes dietéticos - nutrientes ou não. Os mais importantes são ascorbato (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenóides e flavonóides (Diplock et al., 1998).

A vitamina C (ascorbato), importante antioxidante nos fluidos extracelulares (Frei, 1994), é considerada um dos mais poderosos antioxidantes naturais e de menor toxicidade. É hidrossolúvel e encontrada em altas concentrações nos tecidos. O plasma humano contém cerca de 60 μmol ascorbato/L. Como elemento capaz de neutralizar ERO's, o ascorbato é efetivo contra o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio singlete. Em soluções aquosas, a vitamina C também remove efetivamente espécies reativas de óxido de nitrogênio. Há evidências de estudos *in vivo* que a vitamina C é capaz de regenerar tocoferol (Diplock et al., 1998), caso contrário o risco de aceleração da peroxidação lipídica aumentaria (Hughes, 1999).

O termo vitamina E é uma descrição genérica de todos os tocóis e tocotrienóis derivativos que exibem a atividade biológica de α -tocoferol (Diplock et al., 1998). Este último (Figura 2) é a forma de vitamina E mais abundante (Sies et al., 1992) e ativa biológica e quimicamente (Frei, 1994), sendo o mais importante antioxidante *in vivo* (Morrissey & Sheehy, 1999; Noguchi et al., 2000).

Figura 2 - Estrutura do α -tocoferol (Adaptado de Herrera & Barbas, 2001)

Ao contrário da vitamina C, está localizado nas membranas e lipoproteínas, onde pode interromper a reação em cadeia de peroxidação lipídica (Gutteridge & Halliwell, 1994a), neutralizando radicais lipídicos peroxila para produzir hidroperóxidos lipídicos e radical tocoferoxila. Este último pode reagir com outro radical peroxila para formar um aducto. Alternativamente, o radical α -tocoferoxila pode ser reduzido pelo ascorbato e GSH ou oxidado a respectiva quinona. As membranas não contêm grandes quantidades de tocoferóis sendo comum a razão de um tocoferol para cada mil cadeias laterais de ácido graxo (Gutteridge & Halliwell, 1994a; Herrera & Barbas, 2001). A concentração normal de α -tocoferol no homem é de aproximadamente 22 $\mu\text{mol/L}$ (Diplock. et al.,1998).

Grandes variações quanto aos níveis de lipídios plasmáticos estão correlacionados com o tocoferol. Ou seja, indivíduos com hipolipidemia podem apresentar níveis diminuídos de vitamina E embora a deficiência não seja verdadeira. Ao contrário, para os indivíduos com hiperlipidemia, níveis aumentados da vitamina podem ser falsos. Quando os níveis plasmáticos de lipídios são normais, essa relação é menos evidente. Assim sendo, a razão do colesterol ou lipídios totais e tocoferol é mais adequada que o tocoferol isoladamente, na presença de dislipidemia (Machlin, 1991). A vitamina é encontrada no fígado, rim, gordura e adrenais (Diplock. et al.,1998).

Além da ação antioxidante desempenhada pelo α -tocoferol na prevenção da peroxidação lipídica, a referida vitamina, em conjunto com a GSH-Px, participa modulando o metabolismo da cascata do ácido araquidônico iniciada pela lipoxigenase e/ou ciclooxygenase (Reddanna et al., 1989). De fato, estudos em humanos e outros animais sugerem o forte envolvimento do α -tocoferol com a manutenção da função das células imunes (Meydani & Beharka, 1998; Hughes, 1999).

1.3 Antioxidantes e doenças inflamatórias auto-imunes

A maioria das ERO's produzidas durante o processo inflamatório provém de várias células fagocíticas (Babior et al., 1973), especialmente leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos (Biernacki et al., 1988). Quando ativadas, são capazes de produzir grandes quantidades de superóxido e peróxido de hidrogênio (Babior et al., 1973; Biernacki et al. 1988), e, na presença de ferro ou outro metal divalente, a formação de radicais altamente tóxicos como radical hidroxila é estimulada (Biernacki et al., 1988). A injúria do tecido resultante desse processo tenderá a atrair células fagocíticas adicionais, agravando ainda mais a injúria inicial e propagando a resposta inflamatória (Figura 3) (Kehrer & Smith, 1994).

Figura 3 - Radicais livres e inflamação (Adaptado de Kehrer & Smith, 1994)

Na ausência de doença, a produção de ERO's é baixa e a peroxidação lipídica é inibida pela atividade combinada de vários antioxidantes presentes no plasma. Entretanto, no caso de produção excessiva de ERO's, essa proteção pode ser inadequada (Gambhir et al., 1997). A importância real desempenhada pelos radicais e H_2O_2 na doença auto-imune não é totalmente compreendida. No entanto, eles são formados e interagem com prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas e outros moduladores da função imune (Kehrer & Smith, 1994).

Assim sendo, a peroxidação lipídica está ligada à via da ciclooxygenase e o $O_2^{\bullet-}$ está envolvido com a quimiotaxia de neutrófilos, com o fator de ativação plaquetária e fator de necrose tumoral, modificando a produção de oxidantes pelos fagócitos. Oxidantes estão também envolvidos na ativação dos linfócitos T (Halliwell, 1987).

Durante a fagocitose, vários oxidantes potentes são produzidos como superóxido, oxigênio singleto, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. A produção de peróxido de hidrogênio sem controle apropriado poderia, teoricamente, levar à auto-oxidação e prejuízo da habilidade fagocítica, e, em circunstâncias normais, o peróxido de hidrogênio poderia ser modulador da fagocitose (Bieri et al., 1983). Durante a inflamação crônica, esse é um mecanismo de proteção normal que se torna danoso (Halliwell, 1994).

Portanto, a inflamação envolve uma série complexa de eventos intra e extracelulares, e, ainda que sejam indiretas as evidências sugerindo uma importância das ERO's nas doenças inflamatórias, várias terapias antioxidantes experimentais em diversas desordens inflamatórias e doenças infecciosas têm sido testadas (Kehrer & Smith, 1994; Serban & Tanaseanu, 1994). Acredita-se que a vitamina E e o selênio (constituente da GSH-PX) favoreçam o controle da ação antiinflamatória pela modulação da cascata do ácido araquidônico e conseqüente formação de prostaglandinas e leucotrienos (Reddanna et al., 1989).

As doenças auto-imunes são enfermidades inflamatórias crônicas que apresentam variações em relação aos aspectos clínicos e bioquímicos relacionados bem como aos sistemas orgânicos envolvidos (rim, sistema

nervoso central, sistema hematopoiético, etc.). A patogênese da Artrite Reumatóide (AR) e do Lúpus Eritematoso Sistêmico, doenças mais comuns nessa categoria, não é completamente entendida (Lorenz et al., 2001).

O LES é uma doença de etiologia desconhecida (Herrmann et al., 2000), mais prevalente em mulheres (Lahita, 1999). A resposta inflamatória provocado pela formação e deposição local de imunocomplexos antígeno-anticorpo (Kalunian, 1997) é responsável pelas manifestações clínicas de vasculite e o envolvimento de órgãos internos (Waszczykowska et al., 1999). Entre eles destacam-se o sistema nervoso periférico, o coração, os rins, a pele, as membranas serosas, os componentes do sangue, o cérebro e os pulmões (Lahita, 1999). O curso da doença é caracterizado por períodos de exacerbação da atividade e remissão (SWAAK, et al., 2001).

A atividade da doença pode ser definida como manifestações reversíveis do processo inflamatório subjacente. Ela é o reflexo do tipo e gravidade do órgão envolvido. Na literatura, a atividade do LES é usualmente medida pelo grau de envolvimento do sistema orgânico mais afetado (ex. glomerulonefrite ou sistema nervoso central) ou pela atividade sorológica (quantidade de anticorpos anti-DNA) (Bombardier et al., 1992).

A terapia medicamentosa envolve vários medicamentos. Corticosteróides, como a prednisona, são utilizados como supressores agressivos da resposta auto-imune e estabilizam a inflamação resultante. Drogas antiinflamatórias não esteróides (NSAIDS) são igualmente prescritas. Antimaláricos como hidroxicloroquina, são frequentemente usados para moderar manifestações da doença. Drogas citotóxicas como metotrexate, azatioprina e ciclofosfamida são usadas com o objetivo de reduzir a dosagem do esteróide (Patavino & Brady, 2001).

A concentração de antioxidantes essenciais é, em contraste com todas as outras linhas de defesa antioxidantes, determinada pelo seu suprimento dietético. Em decorrência disso, se radicais livres estiverem realmente envolvidos na fisiopatologia das principais doenças, um suprimento adequado desses antioxidantes deve reduzir seu risco (Gey et al., 1993).

Má absorção intestinal no LES foi sugerida por Bazinet & Marin (1971) que observaram um caso com manifestação que incluiu esteatorréia, excreção urinária diminuída da D-xilose e absorção-excreção reduzida de vitamina B₁₂ radioativa. Mader et al. (1997), estudando pacientes com LES e história de dor abdominal e diarreia ocasional, verificaram a prevalência de má absorção em 9,5 % da população estudada.

Heliövaara et al. (1994) avaliaram 1419 indivíduos adultos ao longo de 20 anos e observaram que o risco para artrite reumatóide foi maior quando α -tocoferol, β -caroteno e selênio estavam em proporções menores. Assim sendo, os dados sugeriram que um baixo nível de antioxidante é fator de risco para AR. Lundberg et al. (1992) verificaram que o total de energia da dieta bem como o consumo de caroteno, α -tocoferol, ácido ascórbico e selênio não foram diferentes para 30 pacientes com esclerose sistêmica quando comparados aos indivíduos controle. Contrariamente, ainda que não relacionados ao consumo, foram observados níveis sangüíneos reduzidos desses mesmos nutrientes e é possível que o decréscimo relacionado ao selênio tenha sido resultado de sua menor absorção ou da atividade da doença. A absorção prejudicada de gordura pode ser a causa de valores séricos inferiores para as vitaminas lipossolúveis, enquanto para o ácido ascórbico a diminuição na sua concentração tenha sido reflexo da menor ingestão de frutas ou da maior necessidade orgânica decorrente do processo inflamatório (Gey et al., 1993). De acordo com os autores, as concentrações plasmáticas necessárias de nutrientes antioxidantes que estariam relacionadas com menor risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana seriam, para a vitamina E (padronizada pelo lipídio) > 27,5 -30 $\mu\text{mol/L}$, α e β -caroteno > 0,4 - 0,5 $\mu\text{mol/L}$, vitamina C > 40 - 50 $\mu\text{mol/L}$, e vitamina A (padronizada pelo lipídio) > 2,2 - 2,8 $\mu\text{mol/L}$.

A excreção de alfa-tocoferol se dá especialmente através das fezes e, em menor grau, através da urina. Usualmente menos que 1 % da vitamina E ingerida oralmente é excretada na urina (Machlin, 1991). No entanto, Jordão Jr. et al. (1998) demonstraram que a excreção urinária de α -tocoferol está aumentada nos pacientes com aids e esse achado, de acordo com os

autores, provavelmente contribuiu para a observação de níveis plasmáticos diminuídos da vitamina reportados na pesquisa.

Níveis diminuídos de α -tocoferol podem favorecer danos não específicos a lipídios, proteínas e DNA, causados por ERO's não removidas e espécies de nitrogênio, que não podem ser neutralizadas por antioxidantes (Zimmer et. al., 2000). A vitamina C, ao contrário, apresenta, aparentemente, pequeno efeito protetor em baixas doses (Anderson et al., 1994). Acredita-se que antioxidantes como vitamina C, vitamina E, carotenóides, etc., exerçam ação de proteção por neutralizarem espécies reativas de oxigênio endógenas e exógenas antes que elas possam causar dano ao DNA (Panayiotidis & Collins, 1997). No entanto, a efetividade da terapia antioxidante nas doenças inflamatórias não é bem entendida embora seja importante a contribuição das ERO's na resposta inflamatória. É provável que exista uma variação individual em relação às substâncias mediadoras da inflamação (talvez antioxidante) que são produzidas no sítio da lesão e de lá removidas (Kehrer & Smith, 1994).

Sob condições normais os radicais livres que são produzidos através dos processos biológicos e em resposta aos estímulos externos são controlados por várias enzimas e antioxidantes no organismo. No entanto, parece importante a relação entre os radicais de oxigênio e a peroxidação lipídica no processo de envelhecimento e desenvolvimento de doenças. Os baixos níveis séricos de antioxidantes, especialmente vitaminas, têm igualmente sido apontados como prováveis fatores de risco ou marcadores de doenças como artrite reumatóide e de Lúpus Eritematoso Sistêmico. Portanto, evidências existem no sentido de sugerir que o estresse oxidativo observado na doença inflamatória auto-imune, como Lúpus Eritematoso Sistêmico, não se limita apenas ao local da inflamação e é provável que o desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a defesa antioxidante esteja fortemente envolvido na perpetuação do processo inflamatório e agravamento do estado de saúde. Paralelamente, a peroxidação lipídica observada para essa condição de doença pode estar exacerbada pela excreção de nutrientes antioxidantes através da urina, especialmente α -

tocoferol. Assim sendo, é possível que a geração aumentada de radicais livres, associada a um sistema de defesa antioxidante inadequado, favoreça a peroxidação lipídica e esteja relacionada a atividade da doença e/ou ao *status* do processo inflamatório. Portanto, a compreensão desses mecanismos pode representar um fator importante no tratamento da doença ou contribua na estimativa de sua gravidade.

2 OBJETIVO GERAL

Estudar a peroxidação lipídica e componentes de defesa antioxidante no Lúpus Eritematoso Sistêmico.

2.1 Objetivos específicos

Estimar o grau de peroxidação lipídica e a presença de oxidação de proteínas bem como as concentrações plasmáticas de vitaminas (α -tocoferol e vitamina C) e enzimas antioxidantes (SOD e GSH-Px).

Verificar a presença do dano de DNA de acordo com a atividade da doença;

Averiguar a excreção urinária de α -tocoferol de acordo com o grau de atividade do Lúpus Eritematoso Sistêmico e o *status* do processo inflamatório;

Analisar o efeito do uso de corticosteróide sobre a oxidação de lipídios e proteínas bem como a capacidade de defesa antioxidante em razão da atividade da doença e *status* do processo inflamatório;

Analisar a consequência da presença de lesão renal sobre a oxidação de lipídios e proteínas bem como a capacidade de defesa antioxidante em razão da atividade da doença e *status* do processo inflamatório.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Seleção dos pacientes

Participaram do estudo pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) atendidos na Unidade de Imunologia e Ambulatório de Colagenoses do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP).

O diagnóstico médico da doença e o grau de atividade da doença foram estabelecidos de acordo com Bombardier et al. (1992) que validaram o SLEDAI (“Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index”) (ANEXO A) como instrumento para análise da atividade da doença. Portanto, a doença foi considerada ativa quando o valor de SLEDAI foi superior a 5 conforme recomendado por Courtney et al. (1999).

Foram condições para participação do estudo: o aceite dos termos relativos ao trabalho e propostos no consentimento pós-informado bem como a sua assinatura. O referido documento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP da USP.

Como critérios de inclusão foram consideradas a idade (14 a 59 anos) e a capacidade de locomoção dos pacientes. Para a exclusão foram determinantes o tabagismo, o uso de suplementos vitamínicos contendo α -tocoferol ou vitamina C até 1 mês anterior à data da avaliação, a presença de diabetes melito, aids, disfunção hepática, diarreia intratável (6 ou mais

evacuações líquidas/dia), vômito e/ou evidência de sangramento gastrointestinal.

3.1.2 Caracterização da população

A caracterização da população estudada está descrita na sequência em relação aos grupos formados e ao consumo alimentar.

3.1.2.1 Formação dos grupos

A população estudada foi constituída por 66 indivíduos dos quais 54 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Esses foram avaliados de acordo com a atividade da doença, ou seja, os grupos, segundo esses critérios, foram designados de Grupo Doença Ativa ou Grupo Doença Inativa. Os resultados de ambos foram comparados a um grupo formado por 12 voluntários sadios, denominado de Grupo Controle. A constituição dos grupos está detalhada a seguir:

Grupo Doença Ativa: Formado por 25 pacientes com LES ativo, dos quais 17 (68 %) com comprometimento renal, apresentando a doença em atividade. A análise histopatológica da injúria glomerular de acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), revelou que, dos 12 pacientes classificados de acordo com esse aspecto, 4 (33.33 %) não apresentavam acometimento de membrana basal ao contrário dos demais, isto é 8 (66.67 %), para os quais o referido acometimento foi observado.

Do total de pacientes avaliados, 4 (16 %) nunca haviam recebido tratamento anteriormente para a doença pois tratava-se do primeiro diagnóstico.

Os pacientes do Grupo Doença Ativa foram também caracterizados de acordo com o *status* do processo inflamatório. Esse foi considerado crônico quando os sinais e os sintomas relacionados com a inflamação estavam presentes há mais de 6 semanas da data de coleta das amostras de sangue e de urina. O processo inflamatório foi classificado como agudo quando o aparecimento da sintomatologia ocorreu num período inferior a 6 semanas da obtenção das amostras e foi secundário à ativação da doença.

Do primeiro, Subgrupo Processo Inflamatório Crônico, fizeram parte 17 (68 %) indivíduos enquanto do segundo, Subgrupo Processo Inflamatório Agudo, 8 (32 %) pacientes tomaram parte.

Grupo Doença Inativa: Constituído por 29 pacientes com LES, os quais não apresentavam sinais de atividade da doença por ocasião da seleção. A presença de lesão renal foi verificada para 19 (65,52 %) pacientes do grupo. Segundo a classificação histopatológica da injúria glomerular conduzida para 16 pacientes, o acometimento de membrana basal foi observado para 11 deles (68,75 %). Os demais, 5 pacientes (31,25 %), estavam livres dessa condição.

Grupo Controle - Composto por 12 indivíduos aparentemente sadios e provenientes de diferentes segmentos da comunidade universitária.

Análise adicional foi conduzida com o intuito de avaliar, para os Grupos Doença Ativa ou Doença Inativa, dois aspectos em separado: medicamentos prescritos durante o período em que a avaliação transcorreu e o comprometimento renal. Para o primeiro, medicamentos prescritos, a posologia de prednisona determinou o rearranjo dos pacientes de forma a considerar duas condições: sem antiinflamatório ou com antiinflamatório. Para o segundo, comprometimento renal, a presença ou ausência do referido comprometimento definiu igualmente duas condições distintas, isto é, renal; e não-renal.

3.1.2.2 Consumo alimentar

O consumo alimentar foi estimado para o conjunto de pacientes e foi igual a 1656,82 kcal/dia assim distribuídos: 53,94 % de carboidratos; 17,01 % de proteínas e 29,05 % de lipídios. A adequação da dieta de acordo com o número de porções consumidas de hortaliças e frutas foi verificada quer para o conjunto dos pacientes como para os grupos em separado, demonstrando ser semelhante para o Grupo Doença Ativa e Grupo Doença Inativa.

3.1.3 Procedimento

Os indivíduos selecionados foram orientados a recolher urina durante 24 horas e mantê-la protegida da luz e do calor. Ao final do período de 24 horas, após 12 horas de jejum, o sangue foi coletado. Para os pacientes internados o procedimento foi realizado, sempre que possível, nos primeiros dias da internação. Para os demais, oriundos do ambulatório, a obtenção do material para a pesquisa ocorreu, na maior parte das vezes, uma semana após a avaliação nutricional. Portanto, a obtenção das amostras aconteceu de acordo com a seqüência demonstrada a seguir:

Dia zero: - Consentimento pós-informado;
 - Orientação para a coleta da urina e jejum de 12 horas;
 - Avaliação nutricional (antropometria e consumo alimentar).

Dia um: - Início da coleta da urina.

Dia dois: - término da coleta da urina (α -tocoferol);
 - obtenção de sangue em jejum [plasma (α -tocoferol, vitamina C; malondialdeído, carbonila); sedimento eritrocitário (SOD, GSH-Px); soro (colesterol); sangue total = lesão do DNA)].

3.1.4 Avaliação nutricional e clínica

3.1.4.1 Avaliação nutricional

A avaliação nutricional incluiu dados sobre a composição corporal e o consumo alimentar.

Para o peso e a altura foi utilizada balança digital, marca FILIZOLA, com antropômetro e acurácia de 0,1 kg e 0,5 cm. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi estabelecido pela relação peso e área corpórea (metros quadrados) e a classificação em relação à normalidade, avaliada segundo a OMS (WHO - World Health Organization) de 1995.

A alteração ponderal, representada por ganho ou redução de peso em relação ao habitual, foi quantificada para os indivíduos que foram capazes de prestar a informação.

O consumo alimentar foi estimado em medidas caseiras a partir de um questionário de frequência semanal/mensal contendo cerca de 82 alimentos relacionados, com o número de itens avaliados variando em virtude da época do ano (ANEXO B). Os pacientes e/ou responsáveis foram ainda encorajados a relacionar outros produtos não constantes da referida listagem em decorrência dos hábitos individuais e/ou outros fatores como período do ano e safra agrícola.

O tempo de aplicação do inquérito alimentar durou aproximadamente 30 a 60 minutos. Informação quanto ao consumo *per capita* de óleo e/ou gordura bem como sua origem foi registrada sempre que o dado esteve disponível. O mesmo procedimento foi adotado para outros grupos de alimentos com o objetivo de quantificar, de forma mais precisa, as medidas caseiras indicadas.

Os alimentos foram agrupados em 8 classes a saber: cereais; hortaliças; frutas; leite e derivados; carne; leguminosas; gorduras (óleo, banha, etc.) e açúcar (sacarose) de adição. O consumo individual foi estimado após a transformação das medidas caseiras em porções. A gordura e o açúcar foram quantificados após o cálculo do *per capita* familiar e/ou individual. A média do consumo alimentar foi estabelecida a partir da média da ingestão alimentar total para cada porção das classes de alimentos definida anteriormente e de acordo com Franz et al. (1987), porém calculada para um dia para o conjunto total de pacientes bem como para o Grupo Doença Ativa e Grupo Doença Inativa.

Para a análise da adequação da dieta foram comparadas as medianas de consumo, em porções, das diversas classes de alimentos para todo o conjunto de pacientes com LES e, em separado, para os Grupos Doença Ativa ou Doença Inativa. O Grupo Controle não foi analisado. Para o primeiro, Grupo Doença Ativa, o valor calórico da dieta foi equivalente a 1828,59 kcal assim distribuídos: 58,64 % de carboidratos, 17,99 % de

proteínas e 23,37 % de lipídios. Para o segundo, Grupo Doença Inativa, 54,54 % da energia total fornecida pela alimentação foi proveniente dos carboidratos, 16,46 % das proteínas e 29,00 % dos lipídios, totalizando 1562,46 calorias ao longo do dia.

De acordo com os dados, a mediana de consumo de vegetais e frutas foi de 4,53 e 5,01 porções ao dia ($p > 0,05$).

3.1.4.2 Avaliação clínica

A avaliação clínica, representada pelo histórico da doença e sua evolução, incluiu ainda a revisão da medicação indicada e o conjunto dos sintomas apresentados no período em que a coleta de material foi realizada.

Os dados necessários para definição do *status* do processo inflamatório bem como do valor de SLEDAI foram obtidos dos prontuários e os parâmetros confirmados em conjunto com o médico da clínica. Foram considerados, entre outros, proteína C reativa, α -glicoproteína ácida, VHS, complemento e a presença de anemia normocítica e normocrômica. A caracterização da lesão renal através dos sinais clínicos e biópsia renal foi igualmente referida e comprovada.

3.2 Métodos

As dosagens laboratoriais foram realizadas com amostras de sangue e urina. Esta última foi coletada por um período de 24 horas e o volume da diurese quantificada através de copo graduado com capacidade para 2 litros e acurácia de 10 mL. Após a homogeneização do material, uma alíquota de aproximadamente 50 mL foi extraída, acondicionada em frasco de vidro, protegida da luz e mantida congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

O sangue foi coletado em 2 tubos estéreis, de 10 e 5 mL respectivamente, um dos quais contendo heparina e outro sem a presença do anticoagulante. Da amostra com heparina cerca de 500 μL foram separados e mantidos no escuro, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período máximo de 6 horas até a análise do dano de DNA através do Teste do Cometa. Do

sangue restante foram obtidos o plasma e o sedimento eritrocitário. A preparação de amostras, incluindo separação, lavagem e lise de eritrócitos, foi realizada de acordo com Beutler et al. (1997). Da amostra sem anticoagulante resultou o soro. O processo de separação foi iniciado até no máximo 1 hora após a coleta, em centrífuga refrigerada marca SIGMA, sob temperatura de 4 °C, a 3600 rpm durante 10 minutos. As amostras foram mantidas a -70 °C até a execução da análise.

3.2.1 Peroxidação lipídica (oxidação de lipídios)

Foi empregada a técnica baseada no teste do TBA (ácido tiobarbitúrico). O aduto formado por malondialdeído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) foi separado e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção fluorimétrica. A técnica utilizada e em uso corrente no laboratório foi adaptada a partir de métodos descritos anteriormente (Wong et al., 1987; Fukunaga et al., 1995). Os resultados estão apresentados em $\mu\text{mol/L}$.

Ao ácido tiobarbitúrico (1 mL), 0,4 % em HCl 0,2 N, foram adicionados 0,5 mL de plasma e 0,15 mL de butil hidroxitolueno (0,2% em etanol 95 %). A mistura assim obtida foi mantida em aquecimento a 90°C por 45 minutos, após o que foi rapidamente resfriada em água à temperatura ambiente. Na sequência, 1 mL de butanol foi adicionado, agitado por 1 minuto e centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi injetado no HPLC, nas seguintes condições:

- Coluna = C18 (Waters)
- Fluxo = 1 mL/min
- Fase móvel = Acetato de sódio 95,5 % e ácido acético 4,5 %/metanol (6,5:3,5)
- Detecção: Fluorimétrica (excitação 515 e emissão 550 nm)
- Diâmetro da partícula = 5 micra
- Volume de injeção = 20 μL

Os padrões foram preparados em tetraetoxipropano nas concentrações 0,42, 0,84 e 1,68 μmol respectivamente. Os resultados foram obtidos por comparação e expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.2.2 Grupo carbonila (oxidação de proteínas)

A oxidação de proteínas catalisada por metais foi avaliada de acordo com Odetti et al. (1996). Esses últimos adaptaram para plasma a metodologia descrita por Levine et al. (1990). A técnica baseia-se na introdução de grupos carbonila em resíduos aminoacídicos de proteínas e na reação desses grupos com reagentes específicos.

Amostra de plasma, equivalente a 100 μL , foi adicionada a 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) 20 %. Após agitação da solução, a mesma foi centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Sobre o precipitado foram adicionados 500 μL de dinitrofenilhidrazina (DNFH, 10 mM em HCl 2 M) e a mistura assim formada sofreu agitação durante o intervalo de 1 hora. Quinhentos microlitros de TCA foram novamente adicionados sobre a solução e esta foi centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4 ° C. Novamente o sobrenadante foi desprezado enquanto o precipitado resultante foi lavado com uma combinação de etanol e acetato de etila (1:1). Após mantida a mistura em repouso por 10 minutos, essa foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O precipitado resultante foi dissolvido em 2 mL de hidróxido de sódio (2 M) e a leitura realizada com auxílio de espectrofotômetro marca BECKMAN, a 37°C, contra um branco com HCl (ácido clorídrico), entre os comprimentos de onda de 360 e 390 nm.

Para os cálculos foi usado o coeficiente de extinção molar de 22000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em relação à concentração de proteínas totais no plasma dosado por Kit marca Labtest. O resultado final foi expresso em nmol/mg proteína.

3.2.3 Teste do Cometa (lesão de DNA)

O Teste do Cometa ("Single Cell Gel Assay") foi aplicado com base na descrição de Singh et al. (1988) e Tice & Vasquez (1999). As lâminas

limpas de microscópio receberam uma fina camada de agarose, com ponto de fusão normal e concentração de 1,5 %. Nessa condição foram mantidas durante toda a noite sobre uma superfície plana para a solidificação do gel e armazenadas a temperatura ambiente até a sua utilização subsequente.

Do sangue que foi mantido sob refrigeração a 4 °C, uma alíquota de 5 µl foi acrescentada a 150 µl de agarose de baixo ponto de fusão, a 37 °C e depositada sobre duas lâminas previamente preparadas como descrito anteriormente. Na seqüência, as lâminas foram cobertas com lamínula e mantidas durante 5 minutos sob 4 °C para solidificação do material. Decorrida essa etapa, a lamínula foi delicadamente retirada e uma terceira camada de agarose, baixo ponto de fusão e a 0,5 %, foi adicionada como proteção. Novamente as lâminas foram mantidas sob refrigeração por 5 minutos após o que foram imediatamente imersas em uma solução de lise (NaCl 2,5 M; Na-EDTA 100 mM; Tris 10 mM, pH10, 1 % Triton X-100 e 10 % de DMSO) onde permaneceram por um período mínimo de 24 horas. Na seqüência, as lâminas foram removidas da solução, lavadas com PBS e depositadas, em número de 8, sobre uma unidade de eletroforese contendo solução tampão, a 4°C e pH superior a 13,0 (Na-EDTA 1 mM e NaOH 300 mM). As amostras permaneceram em repouso por 20 minutos nessa solução. A eletroforese foi conduzida durante 20 minutos a 0,6 V/cm e 300 mA com o auxílio da fonte de eletroforese marca Pharmacia modelo EPS 200. Os experimentos foram conduzidos com o mínimo de exposição à luz ambiente. A temperatura do tampão de eletroforese no interior da cuba ao final do processo não ultrapassou a 15 °C.

Após a eletroforese as amostras foram lavadas três vezes, em intervalos regulares de 5 minutos, com Tris 0,4 M e desidratadas 2 vezes com etanol durante 5 minutos. As lâminas foram mantidas desidratadas até a análise.

Para todos os procedimentos de eletroforese, lâminas representando o padrão negativo e positivo foram avaliadas. Para o negativo, foi utilizado sangue periférico obtido de um único doador voluntário sadio, enquanto,

para o positivo, foram utilizadas amostras do sangue dos próprios pacientes, porém tratadas com peróxido de hidrogênio 30 % durante 5 minutos.

As amostras, após o processo de desidratação, foram mantidas em temperatura ambiente até a coloração com 30 μ L de brometo de etídio e examinadas em microscópio de fluorescência (magnificação de 20 x). A análise da presença dos cometas foi realizada por um único observador que avaliou cada lâmina a partir da região central até seu ápice, evitando os extremos da mesma. Para cada lâmina 50 células foram captadas, perfazendo um total de 100 células por amostra.

Utilizou-se o programa para análise de cometas Comet Assay 2.2 da Perceptive Instruments, previamente calibrado para o aumento de 20 vezes. Para o processo de avaliação a identificação prévia das amostras e grupos a que pertenciam foi evitada. A medida selecionada para comparação e análise foi o momento da cauda. Essa representa o produto da porcentagem de DNA na cauda pelo seu comprimento, conforme representado esquematicamente na Figura 4. Na Figura 5 está ilustrado o comportamento da fita de DNA e nas diversas etapas da técnica adotada.

Figura 4 - Representação da cabeça e da cauda do cometa avaliadas pelo Teste do Cometa *

* TICE, R. & VASQUEZ, M. ILS. The pH > 13 alkaline SCG Assay protocol for the application of the pH > 13 alkaline single cell gel (SCG) Assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. 08/30/99 revised. Disponível em: <http://www.cometassay.com/>. Acesso em: 10/01/2002.

Figura 5 - Esquema do comportamento das fitas de DNA em relação às etapas analíticas do Teste do Cometa*

*TICE, R. & VASQUEZ, M. ILS. The pH > 13 alkaline SCG Assay protocol for the application of the pH > 13 alkaline single cell gel (SCG) Assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. 08/30/99 revised. Disponível em: <http://www.cometassay.com/>. Acesso em: 10/01/2002.

3.2.4 Enzimas antioxidantes

Como enzimas antioxidantes foram quantificadas as atividades de glutathiona peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD). Numa primeira etapa se efetuou a determinação de hemoglobina presente nos respectivos hemolisados através de Kit (Labtest®).

3.2.4.1 Glutathiona peroxidase

A presença de GSH-Px na amostra foi baseada no método descrito por Flohé & Günzler (1984), a partir do qual é estimado o consumo de NADPH na reação e a conseqüente queda na absorbância após 5 minutos da adição de t-butil-hidroperóxido. A técnica consistiu em adicionar 50 μ L do sedimento eritrocitário diluído para 2,5 g Hb/dL a 1,9 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0). Na seqüência foram adicionados 0,5 mL de glutathiona reduzida (GSH, 1 mM), 0,5 mL de NADPH (0,2 mM) e glutathiona redutase num volume correspondente a uma unidade. A mistura foi incubada por 5 minutos a 37°C. Foram adicionados em seguida 50 μ L de T-butilhidroperóxido (TBH, 1 mM) e a solução homogeneizada por inversão. Na continuidade, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro marca BECKMAN, a 340 nm e 37 °C. Para o resultado foi considerado para o NADPH um coeficiente de extinção de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A atividade de uma unidade de GSH-Px foi calculada como um μ mol de NADPH consumido por minuto, por grama de hemoglobina.

3.2.4.2 Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada através do Kit RANSOD. Para tal, o sedimento eritrocitário foi diluído com água numa proporção de 1:4 e o produto mais uma vez acrescido de água (1:10). A mistura foi homogeneizada e mantida por 15 minutos a 4°C após o que foi diluída 25 vezes com tampão fosfato (0,01 M, pH 7,0). A análise foi realizada em espectrofotômetro, a 550 nm e 37°C. A absorbância foi quantificada após 30 segundos da reação e até 3 minutos.

A SOD é uma metaloproteína que catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-), produzido durante processos oxidativos, em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular na presença de próton H^+ . O princípio dessa técnica é a formação do ânion superóxido pela xantina na presença de xantina oxidase. O ânion superóxido reage com o 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio cloreto (INT), formando um composto avermelhado. A atividade da SOD é medida pelo decréscimo da inibição dessa reação e, nesse caso, foi considerado que uma unidade dela tenha capacidade de inibir a reação em 50 %. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/g de hemoglobina (U/g Hb). Uma unidade de SOD é descrita como a quantidade de enzima necessária para inibir 50 % da auto-oxidação do pirogalol.

3.2.5 Vitaminas antioxidantes

Como vitaminas com ação antioxidante foram selecionadas α -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C). A primeira foi quantificada no plasma e na urina, enquanto a segunda apenas no plasma. A relação α -tocoferol/colesterol foi igualmente referida através da dosagem desse último no soro.

3.2.5.1 Alfa-tocoferol

Do plasma e da urina retirou-se uma alíquota de 1 mL de amostra que foi homogeneizada em 2 mL de etanol. Na sequência, a mistura foi adicionada sobre 2 mL de n-hexano, agitada por 2 minutos e centrifugada a 1000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante, 1 mL de n-hexano, foi extraído e seco cuidadosamente com nitrogênio. A amostra assim obtida sofreu nova suspensão em 0,5 mL de fase móvel. Para análise do plasma e da urina foram utilizados 100 μ L de amostra.

A concentração de α -tocoferol foi estimada através de HPLC marca Shimadzu, modelo LC-10 AT e nas seguintes condições de trabalho:

- Coluna = C18 (Supercosil - LC - 18 Marca Supelco 25 cm x 4,6 mm)
- Fluxo = 1,5 mL/min

- Fase móvel = Acetonitrila/Diclorometanol/Metanol (70:20:10);
- Detecção: UV/Vis: 292 nm
- Diâmetro da partícula = 5,0 micra
- Volume de injeção = 20 µL

O aparelho foi calibrado com soluções padrão de α -tocoferol (Sigma®) nas concentrações de 10, 20 e 200 µmol/L. Os resultados foram obtidos por comparação e expressos em µmol/L e mg/g colesterol.

3.2.5.2 Ácido ascórbico

Para determinação da concentração de ácido ascórbico no plasma foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) - marca SHIMADZU, modelo LC-9A. A técnica foi uma adaptação do método descrito por Rose & Bofe (1995). As amostras foram acidificadas com ácido metafosfórico a 5 % e o sobrenadante obtido após centrifugação a 4 °C e 3600 rpm. O sobrenadante foi analisado nas seguintes condições de trabalho:

- Coluna = ODS 2 (spherisorb)
- Fluxo = 1 mL/min
- Fase móvel = ácido metafosfórico 2 g/L
- Detecção: UV (254 nm)
- Diâmetro da partícula = 5 micra
- Volume de injeção: 20 µL

O aparelho foi calibrado com soluções padrão de L-(+)ascórbico (Merck®) nas concentrações de 1,0, 0,5 e 0,25 µmol/L. O resultado foi obtido por comparação com os padrões e expresso na mesma unidade (µmol/L).

3.2.6 Colesterol

O colesterol foi determinado por Kit (Labtest®) e espectrofotômetro marca BECKMAN . Ao reagente (1mL) adicionaram-se 10 µl da amostra. Após a mistura de ambos, a substância formada foi mantida em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. A absorbância foi quantificada através de

espectrofotômetro a 37°C e comprimento de onda de 500 nm.. Os valores foram expressos em mg/%.

3.3 Análise dos dados

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi o método de preferência. O teste de Dunn foi utilizado nessa análise para comparação das medianas.

Foi aplicado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes bem como na avaliação do *status* do processo inflamatório, do efeito da terapia medicamentosa e do comprometimento renal.

As medianas seguidas por letras diferentes foram estatisticamente diferentes. Quando não foi observada diferença entre os tratamentos, essa condição foi representada pela expressão ns (não significante).

As correlações entre as diversas variáveis foram estabelecidas pelo coeficiente de correlação não-paramétrica de Spearman.

Para todos os testes escolhidos considerou-se como nível de significância $\alpha = 0,05$. A análise do efeito da terapia medicamentosa e do comprometimento renal foi monocaudal. O programa escolhido para a utilização dos testes supra citados foi o GraphPad. InStat, versão 3.01.

4 RESULTADOS

Os resultados são referentes aos 66 (sessenta e seis) indivíduos estudados. Desses, 54 pacientes portadores de LES, classificados segundo a atividade da doença, isto é, Doença Ativa (n=25) e Doença Inativa (n=29). Doze indivíduos representaram o Grupo Controle.

Os grupos estudados foram, predominantemente, compostos por pacientes do sexo feminino, num total de 52 (96,30 %). O Controle foi constituído exclusivamente por voluntários do sexo feminino.

Quanto à raça, do total de pacientes portadores de LES, 38 (70,37 %) eram brancos, 10 (18,52 %) mulatos, 5 (9,26 %) negros e um (1,85 %) amarelo.

A análise dos dados faz referência aos Grupos Doença Ativa ou Doença Inativa. Para o primeiro, Doença Ativa, o *status* do processo inflamatório foi estabelecido com base no início da sintomatologia relacionado à inflamação e secundária à ativação da doença. Assim sendo, o *status* do processo inflamatório foi designado de agudo quando o início dos sintomas foi inferior a 6 semanas da coleta do material. Ao contrário, o *status* do processo inflamatório recebeu a denominação de crônico quando os sintomas estavam presentes além das 6 semanas referidas anteriormente. Análise adicional permitiu ainda comparação dos dados em relação ao uso da medicação separadamente quer para o Grupo Doença Ativa como para o Grupo Doença Inativa. O mesmo procedimento foi adotado na verificação da influência da presença ou ausência de comprometimento renal.

Para melhor compreensão, os resultados obtidos foram reunidos da seguinte forma: caracterização clínica individual e da doença; marcadores de oxidação de lipídios (MDA), de proteínas (grupo carbonila) e lesão de DNA; antioxidantes (SOD, GSH-Px, α -tocoferol e vitamina C); excreção urinária de α -tocoferol; *status* do processo inflamatório; efeito da terapêutica medicamentosa e comprometimento renal.

4.1 Caracterização individual e clínica da doença

A caracterização individual e clínica da doença incluiu a idade, o IMC, as proteínas de fase aguda (C3 e C4), a proteinúria de 24 horas e a medida de atividade da doença segundo o SLEDAI.

A Tabela 1, a seguir, faz referência à idade dos indivíduos estudados bem como ao IMC. São ainda considerados os dados relacionados às proteínas de fase aguda (C3 e C4) e a proteinúria.

TABELA 1 - Medianas e valores mínimos e máximos para idade, IMC, proteínas de fase aguda (C3 e C4) e proteinúria para os indivíduos controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença

GRUPOS	IDADE (anos)	IMC (kg/m ²)	PROTEÍNAS FASE AGUDA (g/L)		PROTEINÚRIA (g/24 h)
			C3	C4	
CONTROLE	30,00 ^{ab} (21,00-41,00) (n = 12)	21,78 ^b (18,29-28,53) (n = 12)	-	-	-
DOENÇA ATIVA	27,00 ^a (14,00-47,00) (n = 25)	26,67 ^{ab} (16,20-33,98) (n=21)	0,70 ^a (0,20-1,50) (n = 19)	0,10 ^{ns} (0,006-0,70) (n=18)	0,64 ^{ns} (0,01 - 7,04) (n = 20)
DOENÇA INATIVA	40,00 ^b (15,00-58,00) (n = 29)	27,34 ^a (20,11-40,60) (n = 26)	1,02 ^b (0,90 -1,30) (n = 8)	0,20 ^{ns} (0,04-0,50) (n = 9)	0,12 ^{ns} (0,02-0,48) (n = 11)

É possível observar que a mediana de idade dos pacientes no grupo classificado como doença ativa foi 27 contra 40 anos do inativo ($p < 0,05$). O Grupo Controle apresentou mediana de idade equivalente a 30 anos, valor estatisticamente semelhante aos Grupos Doença Ativa ou Doença Inativa.

Quando considerado o Índice de Massa Corporal (IMC) e o grupo dos pacientes para os quais a doença se encontrava na fase inativa, verifica-se que o valor de IMC foi superior ($27,34 \text{ kg/m}^2$) em relação ao Controle ($21,78 \text{ kg/m}^2$) ($p < 0,05$). Para o Grupo Doença Ativa o IMC ($26,67 \text{ kg/m}^2$) não diferiu dos dois considerandos anteriormente.

Estão referidos igualmente na Tabela 1 os valores do complemento (C3 e C4), proteína de fase aguda que compõe o sistema de avaliação SLEDAI. A comparação dos valores de C3 indica que esse diferiu entre os grupos em função da atividade, sendo que a mediana para o Grupo Doença Ativa foi $0,70 \text{ g/L}$, enquanto para o Grupo Doença Inativa essa correspondeu a $1,02 \text{ g/L}$ ($p < 0,05$). Os valores de mediana para C4 não diferiram em decorrência da atividade e corresponderam a $0,10$ e $0,20 \text{ g/L}$, respectivamente ($p > 0,05$).

A mediana de proteinúria no período de 24 horas para o Grupo Doença Ativa foi $0,64 \text{ g/24 h}$ enquanto para o Grupo Doença Inativa esse valor foi equivalente a $0,12 \text{ g/24}$. As medianas testadas foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

4.1.1 Medida de atividade da doença segundo o SLEDAI

Os elementos classificatórios da atividade da doença segundo o SLEDAI indicam que a mediana foi, para o Grupo Doença Ativa, 14 e os valores mínimo e máximo 7,00 e 23,00, respectivamente. Para o Grupo Doença Inativa 0 e 5 representaram os valores mínimo e máximo enquanto 0 foi a mediana de valor de SLEDAI. Para os dois Grupos testados as medianas diferiram no nível de 5 % de significância.

A Tabela 2, na sequência, faz referência à frequência dos achados relativos ao SLEDAI em relação aos Grupos Doença Ativa ou Doença Inativa.

TABELA 2 - Frequência dos elementos de SLEDAI em relação à atividade da doença para o conjunto de pacientes com LES

ACHADOS	GRUPOS	DOENÇA ATIVA	DOENÇA INATIVA	TOTAL
PSICOSE		3		3
VASCULITE		4		4
ARTRITE		9	1	10
CILINDROS URINÁRIOS		5		5
HEMATÚRIA		15	2	17
PROTEINÚRIA		12		12
PIÚRIA		12	5	17
NOVO ERITEMA		6		6
ALOPECIA		3		3
PLEURITE			1	1
PERICARDITE		6		6
COMPLEMENTO BAIXO		12		12
FEBRE		10		10
TROMBOCITOPENIA		2	3	5
LEUCOPENIA			2	2
TOTAL		99	14	113

Observa-se que a hematúria e a piúria foram os achados de maior frequência nos grupos estudados, estando presentes em 17 indivíduos (31,48 %). Em contrapartida a pleurite foi constatada em apenas um indivíduo (1,85 %). Entre os marcadores bioquímicos de inflamação destacou-se o complemento baixo (C3 e C4), numa frequência de 12 indivíduos acometidos (22,22 %). A proteinúria esteve presente em 22,22 % dos indivíduos (12) e a febre em 18,52 % (10 pacientes). A artrite da mesma forma foi evento importante que acometeu 18,52 % da população estudada (10 indivíduos).

Para o Grupo Doença Ativa, os elementos de SLEDAI referidos anteriormente para o conjunto de pacientes foram os mais freqüentes, exceto pela trombocitopenia e leucopenia. Para o Grupo Doença Inativa, os achados ficaram limitados a 6 elementos sendo a frequência inferior à observada para o Grupo Doença Ativa. Foram exceção a pleurite, a trombocitopenia e a leucopenia. Destacaram-se nesse grupo a artrite, a hematúria; a piúria; o complemento baixo.

Quando comparado todo o conjunto de pacientes, o valor de SLEDAI foi correlacionado de forma negativa à idade dos pacientes ($n=54$, $r = -0,41$, $p = 0,002$), conforme representado na Figura 6.

Figura 6 - Dispersão dos valores de SLEDAI e idade em anos para o conjunto de pacientes com LES

4.2 Marcadores de oxidação de lipídios, de proteínas e lesão de DNA

Os marcadores de oxidação de lipídios, isto é, peroxidação lipídica, foram quantificados pela análise do MDA no plasma enquanto a oxidação de proteínas está referida como grupo carbonila. A lesão do DNA foi estabelecida com auxílio do Teste do Cometa e os resultados estão demonstrados na sequência. Os dados para os dois primeiros, peroxidação lipídica e grupo carbonila, estão demonstrados na Tabela 3. Os dados de lesão do DNA estão demonstrados na Figura 7 e a imagem do leucócito como visualizado na análise microscópica, ilustrada na Figura 8.

TABELA 3 - Medianas e valores mínimos e máximos para malondialdeído (MDA) e grupo carbonila para os indivíduos controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença

GRUPOS	MALONDIALDEÍDO ($\mu\text{mol/L}$)	GRUPO CARBONILA (nmol/L)
CONTROLE	0,53 ^{ns} (0,34-1,04) (n = 11)	0,61 ^{ns} (0,16-2,92) (n = 9)
DOENÇA ATIVA	0,71 ^{ns} (0,30-1,81) (n = 22)	0,73 ^{ns} (0,10-4,82) (n = 15)
DOENÇA INATIVA	0,61 ^{ns} (0,11-1,82) (n = 29)	1,13 ^{ns} (0,14-2,70) (n = 21)

Figura 7 - Frequência de valores para o momento da cauda para os indivíduos controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença

Figura 8 – Fotomicrografia de leucócito humano mostrando a migração de DNA induzida por peróxido de hidrogênio (magnificação de 40 x)

4.2.1 Peroxidação lipídica

É possível verificar na Tabela 3 que a mediana de MDA para o grupo cuja doença apresentava-se na fase ativa foi $0,71\mu\text{mol/L}$ ao passo que os valores mínimo e máximo corresponderam a $0,30$ e $1,81\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Para o Grupo Doença Inativa o menor valor observado foi $0,11$ e o maior $1,82\mu\text{mol/L}$ enquanto $0,61\mu\text{mol/L}$ foi o valor da mediana. As amostras testadas não foram diferentes estatisticamente em relação ao Controle ($0,53\mu\text{mol/L}$). Para o último grupo os valores mínimo e máximo foram $0,34$ e $1,04\mu\text{mol/L}$, respectivamente ($p > 0,05$).

Foi observada correlação positiva entre o MDA e a proteinúria para o grupo cuja doença foi classificada como ativa ($n= 17$, $r= 0,72$, $p= 0,001$), como pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Dispersão dos valores de MDA e proteinúria para o Grupo Doença Ativa

4.2.2 Marcador da oxidação de proteínas

A oxidação de proteínas foi analisada pela determinação de grupos carbonila. De acordo com os dados (Tabela 3), o valor para carbonila foi 0,73 nmol/mg de proteína para o Grupo Doença Ativa e 1,13 nmol/mg de proteína para o Grupo Doença Inativa. As medianas de ambos não diferiram em relação ao Grupo Controle (0,61 nmol/mg de proteína) ($p > 0,05$).

Os limites inferior e superior para os valores de grupo carbonila observados para o Grupo Doença Ativa foram 0,10 e 4,82 nmol/mg de proteína, respectivamente e 0,10 e 2,70 82 nmol/mg de proteína para o Grupo Doença Inativa .

4.2.3 Lesão de DNA

Estão representadas na Figura 7 as frequências de momentos da cauda (MC) observadas para os Grupos Doença Ativa ou Doença Inativa bem como para o Grupo Controle.

É possível observar que os limites compreendidos entre 0 e 1,3 foram os mais frequentes para todos os grupos estudados e corresponderam a 78,06; 81,72 e 87,3 % para os Grupos Doença Ativa, Doença Inativa e Controle, respectivamente. Quando a comparação considera o maior limite (5,6 - 6,9), o Grupo Doença Ativa é o que se destaca com uma frequência de 3,27 %.

4.3 Antioxidantes

A capacidade de defesa antioxidante foi avaliada pela dosagem das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase (SOD e GSH-Px) bem como de vitaminas (α -tocoferol e vitamina C). Os resultados estão representados na Tabela 4, na seqüência.

TABELA 4 - Medianas e valores mínimos e máximos para superóxido dismutase, glutatona peroxidase, vitamina C e α -tocoferol para os indivíduos controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença

GRUPOS	ENZIMAS ANTIOXIDANTES		VITAMINAS ANTIOXIDANTES	
	SOD (U/g Hg)	GSH-Px (U/g Hg)	VITAMINA C (μ mol/L)	α -TOCOFEROL (μ mol/L)
CONTROLE	1870,40 ^{ns} (1506,60-2345,80) (n = 12)	16,84 ^{ns} (10,97-30,07) (n = 12)	59,32 ^{ns} (39,51-68,56) (n = 10)	24,12 ^{ns} (20,91-43,39) (n = 12)
DOENÇA ATIVA	1707,10 ^{ns} (853,52-2634,8) (n = 24)	19,27 ^{ns} (10,15-44,13) (n=24)	36,01 ^{ns} (12,06-123,52) (n = 20)	26,38 ^{ns} (16,47-38,40) (n = 24)
DOENÇA INATIVA	1696,20 ^{ns} (909,35-2704,50) (n = 29)	20,60 ^{ns} (5,90-41,59) (n = 29)	48,67 ^{ns} (15,08-108,89) (n = 27)	26,00 ^{ns} (18,14-42,91) (n = 28)

4.3.1 Antioxiooxidantes enzimáticos

De acordo com os dados, as medianas de SOD foram similares para os diversos grupos, não sendo constatada diferença em razão da atividade da doença. Para o Grupo Doença Ativa a SOD correspondeu a 1701,10 U/g Hb enquanto 1696,20 U/g Hb foi o valor obtido para o Grupo Doença Inativa. Para o Controle o resultado da mediana foi 1870,40 U/g Hb ($p > 0,05$).

O menor valor para a enzima superóxido dismutase foi verificada no Grupo Doença Ativa (853,52 U/g Hb) ao passo que o maior o foi para o Grupo Doença Inativa (2704,5 U /g Hb).

Quando analisados os níveis da enzima glutathione peroxidase no eritrócito esses foram semelhantes entre os grupos testados e corresponderam a 19,27, 20,60 e 16,84 U/g Hb, respectivamente para os Grupos Doença Ativa, Doença Inativa e Controle ($p > 0,05$). Limites inferiores para GSH-Px em torno de 10 U/g Hb foram observados para todos os grupos estudados.

As médias para os valores de GSH-Px foram analisados igualmente em relação ao volume de sedimento eritrocitário (mL). Nessa situação os resultados foram, para os Grupos Doença Ativa ou Doença Inativa, 207,47 e 210,30 U/mL, respectivamente. A mediana dos indivíduos Controles foi similar e correspondeu a 229,48 U/mL ($p > 0,05$). Para o Grupo Doença Ativa foi observado o menor valor de GSH-Px por volume de sedimento eritrocitário (41,21 U/mL) seguido do Grupo Doença Ativa (67,56 U/mL). O menor valor para o Grupo Controle foi 130,49 U/mL.

4.3.2 Antioxiooxidantes não-enzimáticos

Os dados relativos às concentrações plasmáticas de vitamina C para os grupos avaliados estão igualmente referidos na Tabela 4. No estado de atividade, as medianas foram 36,01; 48,67 e 59,32 $\mu\text{mol/L}$ para os Grupos Doença Ativa, Doença Inativa e Controle, respectivamente ($p > 0,05$). A menor concentração da vitamina foi verificada no Grupo Doença Ativa (12,06 $\mu\text{mol/L}$) e a maior igualmente no mesmo grupo (123,52 $\mu\text{mol/L}$). Para o Grupo Doença Inativa os limites inferior e superior foram em torno de 10 e

100 $\mu\text{mol/L}$. Para o Grupo Controle, a concentração mais baixa de vitamina C plasmática correspondeu a cerca de 2 vezes o menor valor da vitamina para o Grupo Doença Ativa ou Grupo Doença Inativa.

A concentração plasmática de vitamina C e o valor de SLEDAI foram correlacionados de forma negativa para todo o conjunto de pacientes ($n=47$, $r= -0,30$, $p= 0,04$), conforme representado a seguir na Figura 10. A comparação entre as medianas de vitamina C para os indivíduos para os quais o valor de SLEDAI foi igual a zero (59,04 $\mu\text{mol/L}$; $n=18$) ou variou de 1 a 5 (39,35 $\mu\text{mol/L}$; $n= 9$) indica haver diferença significativa entre os dois parâmetros testados ($p < 0,05$).

Figura 10 - Dispersão dos valores de SLEDAI e vitamina C para o conjunto de pacientes com LES

Na Tabela 4 estão também representadas as concentrações de α -tocoferol no plasma. Constata-se a partir dos dados que essas foram similares entre os diversos grupos, variando de 24,12 $\mu\text{mol/L}$ para o Grupo Controle a 26,38 $\mu\text{mol/L}$ para o Grupo Doença Ativa ($p>0,05$).

Os níveis plasmáticos de α -tocoferol do Grupo Doença Ativa foram correlacionados de forma negativa a α -glicoproteína (dados não mostrados) ($n=12$; $r=-0,59$; $p=0,05$).

Quando os dados de α -tocoferol foram padronizados para o colesterol total a igualdade se manteve. As médias das concentrações da vitamina para todos os grupos testados foram superiores a 5 mg/g.

4.4 Excreção urinária de α -tocoferol

A Tabela 5, na seqüência, contém os dados referentes à excreção urinária de α -tocoferol no período de 24 horas para os grupos avaliados.

TABELA 5 - Mediana e valores mínimos e máximos de excreção urinária de α -tocoferol no período de 24 horas para os indivíduos Controles e pacientes com LES de acordo com a atividade da doença

GRUPOS	DADOS	n	MEDIANA ($\mu\text{mol}/24\text{ h}$)	MÍNIMO E MÁXIMO ($\mu\text{mol}/24\text{ h}$)
DOENÇA ATIVA		24	0,33 ^{ns}	0,03 - 4,09
DOENÇA INATIVA		26	0,40 ^{ns}	0,04 - 4,27
CONTROLE		12	0,44 ^{ns}	0,00 - 1,42

É possível verificar para os Grupos Doença Ativa e Doença Inativa medianas de excreção de 0,33 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ para o primeiro contra 0,40 do segundo e 0,44 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ do Grupo Controle ($p>0,05$).

Quando considerado todo o conjunto de pacientes, a excreção de α -tocoferol foi correlacionada negativamente à proteinúria ($n=31$, $r=-0,45$, $p=0,01$), conforme pode ser observado na Figura 11. Correlação foi observada também entre a excreção de α -tocoferol e SOD para o Grupo Doença Ativa ($n=23$; $r=-0,41$, $p=0,05$) (Figura 12).

Figura 11 - Dispersão dos valores de excreção urinária de α -tocoferol e proteinúria para o conjunto de pacientes com LES

Figura 12 - Dispersão dos valores de excreção urinária de α -tocoferol e SOD para o Grupo Doença Ativa

4.5 Status do processo inflamatório

A Tabela 6, a seguir, contém as medianas referentes ao *status* do processo inflamatório para todos os parâmetros analisados. Os valores mínimos e máximos estão referidos em separado no ANEXO C. É possível verificar que, exceto pela excreção de α -tocoferol através da urina, todos os outros elementos comparados foram semelhantes ($p > 0,05$). A excreção da referida vitamina correspondeu para o Subgrupo Processo Inflamatório Agudo a $0,79 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ enquanto para o Subgrupo Processo Inflamatório Crônico a excreção foi de $0,31 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ ($p < 0,05$).

Quando considerada a excreção de α -tocoferol e SOD, porém em relação ao o *status* do processo inflamatório, a correlação foi negativa para o processo inflamatório agudo ($n=7$, $r = -0,89$, $p= 0,01$). Para o processo inflamatório crônico e para o Controle a correlação não existiu.

TABELA 6 - Mediana dos resultados para os parâmetros estudados de acordo com o *status* do processo inflamatório

STATUS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	n	AGUDO (MEDIANA)	n	CRÔNICO (MEDIANA)
DADOS				
IDADE (anos)	8	29,50 ^{ns}	17	27,00 ^{ns}
SLEDAI	8	14,00 ^{ns}	17	14,00 ^{ns}
PROTEINÚRIA (g/24 h)	6	0,42 ^{ns}	14	0,66 ^{ns}
IMC (kg/m²)	6	25,60 ^{ns}	15	26,67 ^{ns}
EXCREÇÃO α-TOCOF. (μmol/24 h)	7	0,79 ^a	17	0,31 ^b
α-TOCOF. PLASMA (μmol/L)	8	26,17 ^{ns}	16	26,38 ^{ns}
COLESTEROL (mg %)	8	161,53 ^{ns}	16	187,95 ^{ns}
VIT C (μmol/L)	7	32,28 ^{ns}	13	40,91 ^{ns}
GSH-Px (U/g Hb)	8	19,90 ^{ns}	16	19,27 ^{ns}
SOD (U/g Hb)	8	1895,40 ^{ns}	16	1704,90 ^{ns}
MDA PLASMA (μmol/L)	8	0,63 ^{ns}	14	0,76 ^{ns}
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)	5	0,61 ^{ns}	10	0,75 ^{ns}

4.6 Terapêutica medicamentosa

Na Figura 13 estão ilustrados os dados relativos à terapêutica medicamentosa com especial ênfase à prednisona em relação a duas posologias distintas: uma correspondendo à dose de reposição de cortisona (5 - 10 mg/dia) e a segunda, acima de 10 mg, representando o antiinflamatório esteróide. Na categoria outros medicamentos foram inclusos os analgésicos.

Figura 13 - Terapêutica medicamentosa, especialmente com prednisona, para os pacientes com LES em relação à atividade da doença [P 10 = prednisona > 10 mg/dia; P 5-10 = prednisona 5 - 10 mg/dia; C = difosfato de cloroquina; AG = analgésico; NM = nenhum medicamento]

Verifica-se que a prednisona (> 10 mg), isolada ou em combinação com outros medicamentos, foi indicada a 16 indivíduos (29,63 %) para um total de 54 indivíduos avaliados. Essa medicação foi mais freqüente para o Grupo Doença Ativa e correspondeu a uma freqüência de 44 %.

Dose de prednisona de 5 a 10 mg/dia isolada ou combinada ao difosfato de cloroquina foi registrada para o maior número de pacientes, num total de 26 (48,15 %), dos quais 6 (23,08 %) representando o Grupo Doença Ativa e os demais, 20 (76,92 %), pertencentes ao Grupo Doença Inativa.

Imunoglobulina em combinação com a prednisona em dose superior a 10 mg/dia e/ou difosfato de cloroquina, foi verificada para 3 indivíduos (5,55 %) enquanto o ácido acetilsalicílico (AAS) de 100 - 250 mg foi administrado isoladamente para um paciente (1,85 %).

A Tabela 7, na seqüência, considera a mesma terapia medicamentosa registrada na Figura 13, porém relativa a presença ou ausência de comprometimento renal.

TABELA 7 - Terapêutica medicamentosa e comprometimento renal para os pacientes com LES de acordo com a atividade da doença

ATIVIDADE ACHADOS	DOENÇA ATIVA		DOENÇA INATIVA		TOTAL
	R	N/R	R	N/R	
PREDNISONA (> 10 mg)	8	3	2	3	16
PREDNISONA (5 - 10 mg)	6		15	5	26
DIFOSFATO DE CLOROQUINA	1	1		1	3
NENHUM	2	1	1	1	5
ANALGÉSICO		3	1		4
TOTAL	17	8	19	10	54

R = renal ; N/R = não-renal

Observa-se por meio dos dados que a utilização de prednisona na posologia superior a 10 mg/dia, isolada ou em combinação com outros medicamentos, foi mais freqüente no Grupo Doença Ativa com comprometimento renal, tendo sido indicada para 8 indivíduos de um total de 17 (47,06 %). Na mesma situação, porém na ausência de comprometimento renal, a freqüência foi de 3 indivíduos do total de 8 (37.5 %). No Grupo Doença Inativa, a freqüência de uso da medicação referida anteriormente foi mais comum em concentração menor (5-10 mg/dia), correspondendo, para os indivíduos com ou sem comprometimento renal, a 57,69 e 19,23 %, respectivamente.

Na Figura 14 está a representação de outros medicamentos, além do difosfato de cloroquina, utilizados com a prednisona no tratamento do LES. É possível observar que o AAS na concentração de 100 - 250 mg/dia foi o medicamento cuja freqüência de associação foi mais comum, seguido do metotrexato sódico, succinato sódico de metilprednisolona e ciclofosfamida.

Figura 14 - Frequência de uso associado de outros medicamentos no tratamento do LES de acordo com a atividade da doença [S= succinato sódico de metilprednisolona; AAS = ácido acetilsalicílico (100 - 250 mg); AZA = azatioprina; MTX = metotrexato sódico; CICLO = ciclofosfamida]

Os Grupos Doença Ativa ou Doença Inativa são analisados, a seguir, considerando a terapêutica medicamentosa com prednisona. Os indivíduos que receberam dose do medicamento superior a 10 mg/dia foram classificados como recebendo medicação antiinflamatória esteróide, ao contrário dos que receberam 5 a 10 mg/dia de prednisona (dose de reposição). Quando outro medicamento ou nenhum dos considerados anteriormente foi indicado, os pacientes foram classificados como sem medicação antiinflamatória esteróide. Foram estudados os parâmetros referidos nas tabelas anteriores para o Grupo Doença Ativa ou Grupo Doença Inativa e para os indivíduos com ou sem a referida medicação antiinflamatória. Os dados que relacionam os limites mínimos e máximos para os mesmos quesitos estão demonstrados separadamente, para o Grupo Doença Ativa (ANEXO D) e Grupo Doença Inativa (ANEXO E).

A Tabela 8 faz referência ao Grupo Doença Ativa. Verifica-se que dos 25 pacientes estudados, 11 estavam fazendo uso do antiinflamatório por ocasião da coleta do material contra 14 que não o faziam. Dentre os últimos, 6 (24 %) receberam dose de reposição de cortisona.

TABELA 8 - Valores das medianas para os dados analisados quanto à terapêutica medicamentosa (sem ou com antiinflamatório esteróide) para o Grupo Doença Ativa

DADOS	CONDIÇÃO	n	S/ ANTIIN. (MEDIANA)	n	C/ ANTIIN. (MEDIANA)
IDADE (anos)		14	29,5 ^a	11	21,0 ^b
SLEDAI		14	13,00 ^{ns}	11	14,00 ^{ns}
PROTEINÚRIA (g/24 h)		12	0,50 ^{ns}	8	0,91 ^{ns}
IMC (kg/m ²)		12	29,30 ^a	9	21,50 ^b
EXCREÇÃO α -TOCOF. (μ mol/24 h)		13	0,26 ^{ns}	11	0,38 ^{ns}
α -TOCOF. PLASMA (μ mol/L)		13	25,12 ^{ns}	11	30,84 ^{ns}
COLESTEROL (mg %)		13	147,50 ^a	11	208,46 ^b
VIT C (μ mol/L)		10	34,72 ^{ns}	10	34,96 ^{ns}
GSH-Px (U/g Hb)		13	22,38 ^{ns}	11	15,95 ^{ns}
SOD (U/g Hb)		13	1578,79 ^{ns}	11	1465,82 ^{ns}
MDA PLASMA (μ mol/L)		11	0,63 ^{ns}	11	0,73 ^{ns}
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)		8	0,77 ^{ns}	7	0,61 ^{ns}

Entre as variáveis estudadas, diferiram a idade, o índice de massa corporal (IMC) e o colesterol plasmático ($p < 0,05$). As medianas de idade corresponderam a 29,5 e 21,0 anos, para o IMC essas equivaleram a 29,30 e 21,50 kg/m² enquanto para o colesterol plasmático as medianas foram 147,50 e 208,46 mg % para os pacientes sem ou com a terapêutica medicamentosa considerada, respectivamente.

A mediana de excreção de α -tocoferol nas 24 h foi 0,26 μ M para os pacientes que não faziam uso de antiinflamatório contra 0,38 μ M dos demais ($p > 0,05$). Quando analisadas as medianas de α -tocoferol plasmático, estas não diferiram para os dois grupos bem como a vitamina padronizada pelo colesterol plasmático. A vitamina C para ambos foi similar, uma vez que a mediana variou de 34,72 μ mol/L para os indivíduos sem uso de antiinflamatório e 34,96 μ mol/L ($p > 0,05$) para os demais.

As concentrações de enzimas antioxidantes GSH-Px e SOD foram similares para as duas condições avaliadas, isto é, sem ou com antiinflamatório esteróide. O mesmo foi verificado com relação ao MDA e ao grupo carbonila no plasma nas duas condições - uso ou não da medicação.

A Tabela 9 contém os dados no que tange ao Grupo Doença Inativa na condição de uso ou não uso de prednisona em concentração superior a 10 mg/dia, para um total de 5 e 24 pacientes, respectivamente. Na condição de inatividade e sem medicação antiinflamatória, foi observado que a dose de reposição de cortisona foi indicada para 68,97 % da população (21 indivíduos).

TABELA 9 - Valores das medianas para os dados analisados quanto à terapêutica medicamentosa (sem ou com antiinflamatório esteróide) para o Grupo Doença Inativa

DADOS	CONDIÇÃO	n	S/ ANTIIN. (MEDIANA)	n	C/ ANTIIN. (MEDIANA)
IDADE (anos)		24	43,0 ^{ns}	5	38,0 ^{ns}
SLEDAI		24	0 ^{ns}	5	0 ^{ns}
PROTEINÚRIA (g/24 h)		9	0,12 ^{ns}	2	0,11 ^{ns}
IMC (kg/m ²)		21	25,02 ^a	5	33,20 ^b
EXCREÇÃO α -TOCOF. (μ mol/24 h)		21	0,39 ^a	5	0,58 ^b
α -TOCOF. PLASMA (μ mol/L)		23	26,01 ^{ns}	5	25,80 ^{ns}
COLESTEROL (mg %)		24	180,28 ^{ns}	4	162,05 ^{ns}
VIT C (μ mol/L)		22	50,26 ^{ns}	5	47,18 ^{ns}
GSH-Px (U/g Hb)		24	25,02 ^{ns}	5	19,09 ^{ns}
SOD (U/g Hb)		24	1665,23 ^{ns}	5	1897,90 ^{ns}
MDA PLASMA (μ mol/L)		24	0,61 ^{ns}	5	0,44 ^{ns}
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)		17	1,18 ^{ns}	4	0,78 ^{ns}

Dos elementos estudados, variaram o IMC e o α -tocoferol excretado. Para o primeiro, IMC, a mediana foi 25,02 kg/m² para o grupo que não fazia uso de antiinflamatório esteróide e 33,20 kg/m² para os que utilizavam o medicamento. A mediana de excreção de α -tocoferol correspondeu a 0,58 μ mol/24 h para os indivíduos com antiinflamatório contra 0,39 μ mol/24 h dos demais ($p < 0,05$).

Para a vitamina C as medianas de concentração no plasma foram 50,26 μ mol/L para os quais o uso da medicação foi indicado, contra 47,18 μ mol/L na condição contrária ($p > 0,05$). Quando comparados os pacientes sem a medicação, porém, em relação ao fato da doença estar ativa ou inativa, verifica-se que o nível da vitamina no plasma do primeiro diferiu do nível do segundo ($p < 0,05$).

As medianas referentes às concentrações de GSH-Px foram 25,02 e 19,09 U/g Hb para as duas situações, uso ou não uso de antiinflamatório ($p > 0,05$) enquanto para a SOD, nas mesmas condições citadas anteriormente, esses valores foram 1665,23 e 1897,90 U/g Hb, respectivamente ($p > 0,05$).

Para o MDA as medianas foram similares entre as duas condições testadas, e corresponderam a 0,63 μ mol/24 hs para os pacientes sem uso de antiinflamatório esteróide e 0,44 μ mol/24 h para aqueles em uso de antiinflamatório. As medianas para os valores do grupo carbonila corresponderam a 1,18 e 0,78 ($p > 0,05$), respectivamente para a condição sem ou com antiinflamatório esteróide.

4.7 Comprometimento renal

A presença ou a ausência de comprometimento renal, bem como seus efeitos em relação aos diversos parâmetros estudados, são tratados na seqüência, separadamente e são designados de condição renal e não-renal, respectivamente.

A Tabela 10, a seguir, faz referência ao comprometimento renal para o Grupo Doença Ativa, formado por 25 indivíduos.

TABELA 10 - Valores das medianas para os dados analisados quanto ao comprometimento renal (renal ou não-renal) para o Grupo Doença Ativa

DADOS	CONDIÇÃO	n	RENAL (MEDIANA)	n	N/ RENAL (MEDIANA)
IDADE (anos)		17	29,00 ^{ns}	8	25,50 ^{ns}
SLEDAI		17	14,00 ^{ns}	8	10,00 ^{ns}
PROTEINÚRIA (g/24 h)		14	0,88 ^a	6	0,10 ^b
IMC (kg/m ²)		16	27,66 ^{ns}	5	21,50 ^{ns}
EXCREÇÃO α -TOCOF. (μ mol/24 h)		17	0,26 ^{ns}	7	0,59 ^{ns}
α -TOCOF. PLASMA (μ mol/L)		17	25,94 ^{ns}	7	28,99 ^{ns}
COLESTEROL (mg %)		17	205,00 ^{ns}	7	145,05 ^{ns}
VIT C (μ mol/L)		14	39,03 ^{ns}	6	32,89 ^{ns}
GSH-Px (U/g Hb)		17	18,74 ^{ns}	7	19,80 ^{ns}
SOD (U/g Hb)		17	1707,02 ^{ns}	7	1714,18 ^{ns}
MDA PLASMA (μ mol/L)		17	0,73 ^a	6	0,40 ^b
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)		10	0,70 ^{ns}	5	0,76

Do total de pacientes, 17 apresentavam comprometimento renal enquanto para 8 a mesma condição não foi observada. Em relação aos elementos avaliados, diferiram a proteinúria e o MDA. Para o primeiro, a mediana de proteinúria foi 0,88 g/24 h para os indivíduos com comprometimento renal e 0,1 g/24 h para os demais ($p < 0,05$). A peroxidação lipídica avaliada através da mediana do MDA, correspondeu, para os pacientes com comprometimento renal a 0,73 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$. Para os que não apresentavam comprometimento renal, o MDA foi 0,40 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ($p < 0,05$).

A mediana de excreção de α -tocoferol variou de 0,26 a 0,59 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ para as condições presença ou ausência de comprometimento renal, respectivamente ($p > 0,05$). Os demais dados estudados, SLEDAI, α -tocoferol plasmático, colesterol, α -tocoferol plasmático padronizado pelo colesterol, GSH-Px, SOD e grupo carbonila foram similares para ambas as condições avaliadas.

A Tabela 11 contém os dados relativos aos pacientes com LES inativo com ou sem comprometimento renal. Dos pacientes analisados, 19 apresentavam comprometimento renal ao passo que 10 estavam livres dessa condição.

Os limites mínimos e máximos para todos os parâmetros analisados e para os dois grupos estudados, Doença Ativa ou Doença Inativa, estão relacionados em anexo (ANEXO F e ANEXO G, respectivamente).

TABELA 11 - Valores das medianas para os dados analisados quanto ao comprometimento renal (renal ou não-renal) para o Grupo Doença Inativa

DADOS	CONDIÇÃO	n	RENAL (MEDIANA)	n	N/ RENAL (MEDIANA)
IDADE (anos)		19	37,00 ^{ns}	10	44,00 ^{ns}
SLEDAI		19	0,00 ^{ns}	10	0,00 ^{ns}
PROTEINÚRIA (g/24 h)		11	0,12	0	-
IMC (kg/m ²)		18	27,34 ^{ns}	8	28,59 ^{ns}
EXCREÇÃO α -TOCOF.(μ mol/24 h)		18	0,45 ^{ns}	9	0,41 ^{ns}
α -TOCOF. PLASMA (μ mol/L)		18	26,62 ^{ns}	10	23,73 ^{ns}
COLESTEROL (mg %)		19	177,89 ^{ns}	9	174,56 ^{ns}
VIT C (μ mol/L)		19	43,91 ^{ns}	8	59,04 ^{ns}
GSH-Px (U/g Hb)		19	27,94 ^{ns}	10	19,50 ^{ns}
SOD (U/g Hb)		19	1552,77 ^a	10	1905,47 ^b
MDA PLASMA (μ mol/L)		19	0,58 ^{ns}	10	0,63 ^{ns}
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)		14	1,22 ^{ns}	7	1,06

Diferiu entre as condições testadas a mediana de SOD eritrocitária, cuja concentração correspondeu a 1552,77 e 1905,47U/g Hb respectivamente para os indivíduos com comprometimento renal em relação aos pacientes para os quais o referido comprometimento não foi observado. As medianas dos demais elementos analisados, como SLEDAI, IMC, excreção de α -tocoferol e α -tocoferol plasmático, vitamina C, SOD, GSH-Px, MDA e grupo carbonila, foram similares para ambos os casos, ou seja, presença ou ausência de comprometimento renal.

5 DISCUSSÃO

A progressão do LES tem sido tradicionalmente descrita como apresentando períodos não previsíveis de exacerbação e remissão da atividade da doença, o que significa que a enfermidade apresenta padrões de atividade variáveis e que incluem recidiva, períodos quiescentes, e de atividade crônica (Barr et al., 1999).

A caracterização da recidiva, para efeitos didáticos, considerou, essencialmente, o período a partir do qual iniciaram-se os sintomas relacionados à inflamação, especialmente em razão da ativação da doença. Essa condição relativa ao tempo foi denominada *status* do processo inflamatório e dois subgrupos estão identificados como pertencentes ao Grupo Doença Ativa. São eles: processo inflamatório agudo e processo inflamatório crônico. Do primeiro, fizeram parte 8 (32 %) pacientes. Desse total, 3 (37,5 %) nunca receberam tratamento para a doença pois se tratava do primeiro diagnóstico. Dos demais, 17 (68 %) indivíduos portadores de LES, 16 apresentavam a doença anteriormente, exceto um paciente, de forma crônica, ativa ou inativa. Os resultados decorrentes da adoção do critério *status* do processo inflamatório permitiram a discriminação de alguns aspectos relacionados à doença que são discutidos na sequência.

Os dados do Controle foram comparados aos grupos Doença Ativa ou Inativa.

Segue ainda consideração adicional acerca do efeito do uso da terapia medicamentosa com antiinflamatório esteróide (prednisona em dose superior a 10 mg/dia) em relação aos parâmetros testados e para cada

grupo em separado, exceto o Controle. A concomitância de comprometimento renal no LES foi outro elemento importante no entendimento dos resultados obtidos e é tratada nessa discussão.

5.1 Caracterização individual e clínica da doença

5.1.1 Idade e sexo

A diferença observada para os grupos em relação à idade sugere que a doença mostrou-se em atividade numa proporção maior em pessoas mais jovens, atingindo ou mantendo-se inativa com o avançar dos anos. Esse efeito, no entanto, foi menos pronunciado para o grupo cujo processo inflamatório foi caracterizado como agudo em comparação ao grupo classificado como crônico. Há evidências de que, muito provavelmente, a idade esteve de alguma forma relacionada ao achado e foi coincidente com a maior predisposição para a ativação da doença nos indivíduos mais jovens. Tal afirmativa é reforçada pela correlação negativa observada entre a idade e o valor de SLEDAI para todo o conjunto de pacientes.

O sexo feminino foi predominante em todos os grupos estudados visto que o LES é uma doença comum a mulheres jovens no mundo todo, numa proporção de 10 mulheres para cada homem. Grupos raciais como negros e hispânicos estão também relacionados à incidência da doença e são afetados de forma mais grave e freqüente que outros (Kimberly, 2001).

5.1.2 Índice de massa corporal (IMC)

Ainda que tenha havido pequena variação quanto ao índice de massa corporal entre os diferentes grupos, esta não foi estatisticamente significativa exceto pelo Grupo Controle, considerado normal em relação aos demais cujo IMC foi indicativo de sobrepeso (OMS, 1995).

Interessante observar que, quando comparados os grupos segundo a atividade da doença, o Doença Ativa foi o grupo para o qual a freqüência de perda de peso se mostrou maior quando comparado ao Doença Inativa.

Como principal causa para esse efeito foi apontada a própria enfermidade. O Grupo Doença Inativa, ao contrário, registrou a maior porcentagem de pacientes que referiram ganho ponderal. Dos que perderam peso, a grande maioria o fez voluntariamente por restrição alimentar.

Embora a diferença relativa ao IMC entre os grupos Doença Ativa e inativa não fosse estatisticamente significativa, é evidente que o evento de perder peso é importante no processo doença.

O processo inflamatório, independente do sítio ou sítios de inflamação, pode desencadear respostas sistêmicas diversas. Estas mudanças têm sido referidas como resposta de fase aguda, embora possam acompanhar desordens inflamatórias crônicas (Gabay & Kushner, 1999). Em geral, a magnitude da resposta de fase aguda está relacionada à gravidade do estado inflamatório ou à extensão da injúria tecidual (Kushner, 1988). Munro e Capell (1997) verificaram que a perda de peso é uma condição multifatorial em pacientes do sexo feminino portadoras de artrite reumatóide (AR), que se torna ainda mais importante quando a resposta de fase aguda está da mesma forma exacerbada. Entre os fenômenos de fase aguda que podem direta ou indiretamente interferir sobre o peso do indivíduo destacam-se mudanças neuroendócrinas (febre, sonolência e anorexia) e alterações metabólicas (perda de massa magra e balanço nitrogenado negativo, lipólise aumentada no tecido adiposo e caquexia). A caquexia, a perda de massa corporal que ocorre na doença inflamatória crônica grave, resulta do decréscimo no músculo esquelético, gordura tecidual e massa óssea (Gabay & Kushner, 1999). Células fagocíticas são predominantemente responsáveis pelo aumento na produção de mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias (mediadores importantes da resposta inflamatória) [interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α)], prostaglandinas, leucotrienos, antioxidantes e moléculas oxidantes (superóxido, ácido hipocloroso, peróxido de nitrogênio e óxido nítrico (Grimble, 1997).

Em contrapartida, o ganho de peso referido especialmente por pacientes pertencentes ao Grupo Doença Inativa pode ter como fator de contribuição a medicação. Essa afirmativa está baseada numa propriedade do corticosteróide qual seja a de estimular o apetite (Quismorio Jr., 1993). Considerando que, dos 29 integrantes do Grupo Doença Inativa, 20 (68,97 %) faziam uso de corticosteróide (dose de reposição), a possibilidade de o mesmo contribuir com o ganho de peso parece importante. Soma-se a esse fato a observação de IMC indicativo de obesidade entre os indivíduos cuja posologia de prednisona foi superior a 10 mg/dia ainda que não esteja referido o tempo de uso da medicação em questão.

5.1.3 SLEDAI

Os itens relacionados ao SLEDAI avaliados clínica e laboratorialmente estão no ANEXO A. A atividade da doença pode ser definida como as manifestações reversíveis do processo inflamatório subjacente (Bornbardier et al., 1992) e que podem afetar muitos sistemas orgânicos. A Figura 15, a seguir, resume a frequência dos sistemas afetados descritos anteriormente para o total de pacientes estudados.

Figura 15 - Frequência dos sistemas orgânicos afetados pelo LES de acordo com o SLEDAI

Chama a atenção o fato de serem mais freqüentes, segundo o SLEDAI, a hematúria, a piúria, a proteinúria e o complemento baixo. Os 3 primeiros caracterizam a nefrite lúpica (Pollak & Pirani, 1993), enquanto o último, complemento, é ativado pela formação de complexo antígeno-anticorpo no LES (Walport, 2001). Na realidade, o envolvimento renal é um evento freqüente e sério nessa doença. Clinicamente, a doença renal é reportada em cerca de 50 % dos pacientes durante o primeiro ano de diagnóstico da doença e, essa prevalência, cresce nos anos que se seguem (Pollak & Pirani, 1993). Em relação ao grupo analisado, 66,67 % apresentaram o LES renal, independentemente da atividade.

O valor médio referente ao grau de atividade da doença obtido de acordo com o SLEDAI estabelece a diferença entre os grupos Doença Ativa e Doença Inativa de acordo com essa classificação. Cabe ressaltar no entanto que, para o Doença Inativa, o desvio padrão aumentado foi resultado da variação observada para os valores de zero a 5.

O fato de haver correlação negativa entre os valores de SLEDAI e os níveis séricos de vitamina C para todo o conjunto de pacientes ($n=47$, $r = -0,30$, $p = 0,04$) (Figura 10) permite questionar a possibilidade de um fator protetor, decorrente da presença de níveis aumentados de antioxidantes em nível plasmático ou, ao contrário, o metabolismo acelerado da vitamina como resultado da atividade da doença favorecendo a sua redução no plasma.

Os dados obtidos não caracterizam que a ativação da doença poderia ser retardada ou efetivamente evitada a partir de uma proteção antioxidante extra, especialmente porque a diferença relativa às médias das concentrações de vitamina C plasmática entre os grupos não foi estatisticamente significativa, exceto quando a comparação considerou a mediana para os dois grupos e a ausência do medicamento antiinflamatório ($p < 0,05$). No entanto, é provável que a ausência completa de qualquer sinal ou sintoma medido através do SLEDAI tenha contribuído para a diferença entre os níveis séricos da vitamina. A afirmativa é corroborada pela observação de diferença significativa entre as medianas de vitamina C

plasmática para os pacientes com valores de SLEDAI foram zero quando comparados àqueles para os quais esses valores variaram de 1 a 5.

Como o LES é uma doença auto-imune, caracterizada por uma grande variedade de sintomas, a etiopatogênese, embora parcialmente compreendida, é multifatorial. Estão envolvidos fatores ambientais e genéticos (Hermann et al., 2000). Portanto, o suposto papel protetor exercido pela vitamina C na manutenção da condição de inatividade da doença é sugerida a partir da idéia de que um possível dano oxidativo possa preceder o início dos sintomas e o diagnóstico de doenças como Artrite Reumatóide (AR) e, possivelmente, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). Logo, baixos níveis séricos de antioxidantes poderiam estar envolvidos. Como possíveis causas, foram propostos o consumo insuficiente, a absorção ou o transporte inadequados (Comstock et al., 1997), a decomposição ou a excreção aceleradas desses antioxidantes (Herrick et al. 1996).

5.1.4 Complemento

A análise do complemento indicou que, quando a doença mostrava-se em atividade, a média do valor de C3 para o Grupo Doença Ativa foi caracterizada por valor inferior ao normal (0,9 a 1,8 g/L).

Para C4, a mesma diferenciação não foi evidente e os valores demonstraram estar dentro dos limites de normalidade (0,1 a 0,4 g/L).

O complemento baixo representado por C3 e C4 é resultado do decréscimo na sua concentração estimulado pelo processo inflamatório. É considerado um parâmetro de ativação da LES porque, muito provavelmente, a deposição de imunocomplexos ativa o sistema de complemento com seu consumo a seguir. A ativação do sistema de complemento leva à estimulação do sistema celular imune com infiltração de granulócitos e linfócitos. A excreção de enzimas lisossomais e radicais de oxigênio pode finalmente causar dano tecidual resultando em proteinúria e falência renal (Hermann et al., 2000).

5.1.5 Proteinúria

Os dados relativos à correlação entre proteinúria e excreção de α -tocoferol para todo o conjunto de pacientes (Figura 11) ($n=31$, $r= -0,45$, $p= 0,01$) sugerem que a excreção da vitamina não foi dependente da de proteína. Portanto, posto que a mesma correlação tenha sido observada para o Grupo Doença Ativa porém do Subgrupo Processo Inflamatório Crônico ($n=14$; $r=-0,74$; $p= 0,003$), e considerando que os pacientes com comprometimento renal não apresentaram maior excreção dessa vitamina através da urina, supõe-se que diversos elementos sejam importantes ou favoreçam a excreção da vitamina. Por conseguinte, fatores outros que não a atividade da doença por si só ou a proteinúria propriamente determinam a excreção de α -tocoferol na urina.

O rim representa uma barreira contra as perdas do meio interno e mecanismos existem no sentido de favorecer a absorção da proteína filtrada, tornando a urina essencialmente desse elemento. Várias doenças glomerulares estão relacionadas ao aumento da excreção urinária de proteína além do que essa condição pode ser secundária ao dano imunológico e a inflamação (Koeppen & Stanton, 1997).

5.2 Dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA

5.2.1 Peroxidação lipídica

Conforme referido nos resultados, o nível de peroxidação lipídica medido através do MDA no plasma não diferiu entre os grupos, o que sugere que essa não esteve aumentada em decorrência da atividade da doença e/ou status do processo inflamatório. O mesmo resultado foi observado para Viana (1998) em relação à medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na urina de 24 horas de ratos submetidos a processo inflamatório agudo.

Michel et al. (1997) estudaram a peroxidação lipídica através do MDA no plasma em crianças com LES ativo e inativo e observaram que não

houve diferença quanto a esse parâmetro entre os grupos estudados. Resultado semelhante foi obtido por Situnayake et al. (1991) porém com pacientes com AR. Os autores não detectaram concentrações aumentadas de malondialdeído em pacientes com artrite reumatóide, ao contrário, nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi significativamente maior para o Grupo Controle. Todos os pacientes estavam fazendo uso das doses máximas de antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) e 50 % deles faziam uso de drogas imunossupressoras. De acordo com os autores, os resultados díspares foram consequência do efeito inibidor desses antiinflamatórios sobre a formação de radical.

Mohan & Das (1997) estimaram as concentrações plasmáticas de peróxidos de lipídios, antes e após a indução da remissão seguindo administração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em pacientes com LES. Os resultados mostraram que os níveis de peróxidos de lipídios estavam elevados anteriormente ao tratamento. Seguindo a administração de EPA/DHA, a concentração de peróxidos de lipídios reverteu-se para níveis próximos do normal, sugerindo que EPA/DHA têm um efeito modulador do estresse oxidativo, participando ainda na síntese de óxido nítrico bem como na regulação e síntese de enzimas antioxidantes como SOD e glutathione peroxidase. Dos resultados desse estudo, os autores propuseram que medidas da peroxidação lipídica, óxido nítrico e antioxidantes podem ser usadas como marcadores para predizer o prognóstico da doença para pacientes com LES.

De acordo com Kehrer & Smith (1994), o teste do MDA apresenta limitações visto que a relação causa/efeito é muitas vezes ignorada pois existem distinções entre os mecanismos de iniciação da injúria e aqueles responsáveis pela propagação da lesão. De acordo com os autores parece importante considerar que os lipídios da membrana são muito mais susceptíveis à peroxidação após a morte celular, especialmente quando os hidroperóxidos de lipídios são avaliados como mecanismos ao invés de marcadores da morte celular. Segundo Gutteridge & Halliwell (1994a), as razões para o aumento da susceptibilidade para peroxidação dos tecidos

que sofreram danos incluem inativação de alguns antioxidantes e a liberação de íons metálicos (especialmente ferro e cobre) dos sítios de armazenamento dentro das células. As metaloenzimas representam um exemplo pois são destruídas por proteases lipossomais liberadas e os íons metálicos são essenciais para a peroxidação lipídica estimulada pela decomposição de peróxidos de lipídio a produtos citotóxicos.

A análise do MDA envolve a estimativa de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico que não são específicas para o malondialdeído (Morrissey & Sheehy, 1999) e, não obstante essa limitação (Templar et al., 1999), a técnica continua sendo uma das mais empregadas na avaliação da peroxidação lipídica (Kehrer & Smith, 1994). Cabe, no entanto, esclarecer se os dados conflitantes disponíveis na literatura em relação ao processo de peroxidação lipídica avaliado através desse teste em pacientes portadores de LES e/ou AR refletem a irreprodutibilidade e inacurácia do método, a complexidade da doença ou ambos.

5.2.2 Oxidação de proteína

A oxidação de proteína avaliada através do grupo carbonila não se mostrou diferenciada entre os grupos, quer pela atividade ou status do processo inflamatório. A ampla variância de dados observada no presente estudo para cada grupo individualmente sugere que vários aspectos relacionados à própria doença, e que afetam o acometimento dos diversos órgãos, comprometeram a análise dos resultados, não permitindo, portanto, estabelecer a existência de oxidação protéica aumentada em decorrência da doença. Ainda assim, a oxidação de proteínas é um instrumento importante no estudo do estresse oxidativo (Frei & McCall, 2001) e foi sugerida como um marcador clínico na avaliação de artrite juvenil crônica por Renke et al. (2000). Os autores avaliaram uma população de 52 crianças com diagnóstico de Artrite crônica juvenil de diferentes tipos e atividades. Os resultados indicaram que o conteúdo de carbonila nas proteínas do plasma das crianças doentes foi significativamente maior quando comparado ao grupo sadio. O grupo carbonila aumentou paralelamente com a atividade da

doença e seu conteúdo foi significativamente mais alto em crianças cujo índice de atividade estava aumentado em relação àquelas cuja atividade da doença mostrava-se média ou baixa.

Na presença de O_2 , Fe^{+3} ou Cu^{+2} , e um doador de elétron, sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de geração de radicais livres de oxigênio catalisam a modificação oxidativa de proteínas. Quando as proteínas estão expostas a sistemas de oxidação catalisada por metal, poucos resíduos de aminoácidos são modificados e relativamente poucos peptídios são degradados, ao contrário de quando elas são expostas a radicais produzidos por alta energia de radiação. O significado biológico dessa reação está relacionado, entre outras coisas, ao acúmulo intracelular de enzimas com o avançar dos anos, estresse oxidativo, e vários estados patológicos, incluindo AR (Stadtman, 1990).

5.2.3 Lesão de DNA

A maior vantagem de usar o momento da cauda como um índice da lesão do DNA é que ambas as quantidades de dano de DNA e distância de migração do material genético na cauda estão representadas por um único número. No entanto, a sua análise, nas condições do experimento, não permitiu estabelecer a existência de lesão aumentada de DNA em decorrência do LES e/ou atividade da doença. No entanto, parece imprescindível analisar alguns aspectos relacionados à técnica a fim de compreender o resultado obtido.

A eletroforese de células individuais através do Teste do Cometa é uma técnica que emprega microscopia de fluorescência para a análise das células e tem a vantagem de ser sensível e rápida para detecção de lesão de DNA em um variado tipo de células (Mckelvey-Martin et al., 1993), e esse dano é demonstrado pela migração crescente de material genético na direção da eletroforese (Green et al., 1994). A quantificação da extensão da lesão se dá pela medida do deslocamento do material genético entre o núcleo da célula ou cabeça do cometa e a cauda resultante. Esta última, de acordo com Collins et al (1997), é formada por alças relaxadas de DNA.

O número dessas alças na cauda indica a freqüência de rompimento do DNA. Esse modelo combina com a observação de quantidades crescentes de dano de DNA e intensidade aumentada da cauda.

A ruptura da fita de DNA é a principal espécie de dano oxidativo e, quando pouco freqüente, pode ser reflexo de dano oxidativo endógeno que ocorre por espécies reativas de oxigênio durante a respiração, o que significa que pode ser de vida curta, sofrendo rápido reparo. Portanto, não é claro até que ponto a lesão do DNA em células não tratadas com peróxido, ou outro agente, representa dano do DNA ou o seu reparo (Panayiotidis & Collins, 1997). A incidência de cometas sem um núcleo claramente identificável é normalmente bem abaixo de 5 % de todos os cometas presentes na lâmina do microscópio. A maior vantagem de usar a eletroforese de célula individual é que ela informa sobre as diferenças intercelulares. Assim sendo, o teste considera a população como um todo e a célula individualmente (Hellman et al., 1995).

Quando o Teste do Cometa é aplicado em células de sangue total, como no presente estudo, apenas as células nucleadas representam a fração através da qual a lesão de DNA é medida. O sangue total contém cerca de $5 \text{ a } 10 \times 10^6$ leucócitos por mL. A proporção das várias células brancas polimorfonucleares e mononucleares varia consideravelmente, porém a maior fração, cerca de 60 - 70 %, é de neutrófilos. Na fração de células mononucleares, cerca de $1\text{-}2 \times 10^6$ células por mL podem ser separadas do sangue total por gradiente ficol. Dentro dessa fração, cerca de 70 % das células são linfócitos T. Os últimos são constituídos de cerca de 70 % da fração de células mononucleares (Green et al., 1994). Portanto, as células brancas do sangue representam uma mistura de diferentes populações de células com diferentes capacidades de reparo de DNA, bem como tempo de vida variável (Srám et. al., 1998). A opção de se empregarem para o experimento células do sangue total foi com o intuito de reproduzir *in vivo* a situação o mais próxima possível da real. A

possibilidade de utilizar a amostra até 24 horas após a coleta de sangue* foi igualmente considerada vantajosa .

É possível que o peróxido de hidrogênio cause ruptura de fita de DNA pela geração de radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) próximo da molécula de DNA, via reação de Fenton. Esse efeito pode resultar em instabilidade, mutagênese e carcinogênese (Duthie et. al., 1997). Portanto, a integridade do DNA é fundamental no sentido de evitar mutações e, conseqüentemente, senescência ou morte celular.

Bashir et al. (1993) propuseram que a hipersensibilidade ao estresse oxidativo e níveis aumentados de dano ao DNA em doenças auto-imunes podem estar associados com perda da capacidade de reparo do dano do DNA. Estudos envolvendo aberrações cromossômicas nas células de pacientes com LES, AR e Esclerose Sistêmica (ES), sugerem que incremento no dano ao DNA ou a perda da capacidade normal de reparação existem. O mecanismo responsável pelo reparo do DNA em células de pacientes com LES, AR juvenil e esclerose sistêmica é desconhecido. Questiona-se se o defeito no reparo de DNA levaria à auto-imunidade ou seriam os anticorpos contra as proteínas responsáveis pelo reparo de DNA que causariam o retardo (McCurdy et al., 1997). De acordo com Blount et al. (1989), a inflamação crônica no LES pode gerar quantidade de ERO's capaz de desnaturar o DNA, favorecendo a indução da resposta imune e formação de auto-anticorpos de DNA.

A avaliação do dano pela análise de leucócitos não tratados indica que o rompimento de fita não é um bom índice para dano oxidativo endógeno. Isso poderia ser devido ao fato de algum dano de DNA estar continuamente presente na célula e que o rompimento de fita ocorre como intermediário no processo de reparo no qual enzimas especializadas reconhecem anormalidades e as removem por excisão, ressíntese e replicação das fitas de DNA. Além disso, o teste do cometa detecta não apenas danos de fita simples, mas também sítios lábeis ao álcali. Assim

* SPEIT, G. In: WORKSHOP COMET ASSAY, 1999, Botucatu: Faculdade de Medicina - Departamento de Patologia - UNESP - SP (informação verbal).

sendo, pode ser difícil discriminar entre o dano endógeno real e aquele produzido durante o processamento com soluções alcalinas (Rizo, 1999).

Caso fosse atribuído um valor de zero a 4 a cada limite estabelecido para o momento da cauda e referido nos resultados através da Figura 7, o primeiro ou zero, sugeriria que cerca de 80 % das células não apresentariam dano de DNA. Para o valor 1, a frequência seria ao redor de 10 % enquanto para os demais valores essa seria ainda menor. Não existem dados que permitam comparação de valores de momento da cauda visando a estabelecer limites de normalidade para esse parâmetro. No entanto, acredita-se que as frequências referidas estão dentro de limites que poderiam ser aceitáveis, especialmente se considerados os dados em comparação ao Controle.

5.3 Defesa antioxidante

5.3.1 Enzimas antioxidantes

Em decorrência dos resultados obtidos para as análises de SOD e GSH-Px e considerando que esses não variaram para os diversos grupos, sugere-se que a atividade de ambas não foi afetada pela condição de atividade da doença (ativa ou inativa) em relação ao Controle ou *status* do processo inflamatório (agudo ou crônico). No entanto, a análise dos valores mínimos e máximos para a SOD evidencia claramente concentrações cerca de 1,6 vezes menores para o Grupo Doença Ativa ou Doença Inativa quando comparados aos menores valores do Grupo Controle. Em relação aos valores superiores, ainda para a SOD, igualmente os Grupos Doença Ativa e Doença Inativa destacaram-se em relação ao Controle ainda que a diferença entre eles foi numericamente menos importante.

Quando confrontados os valores mínimos e máximos para a GSH-Px, as diferenças foram menos evidentes. A análise da atividade da GSH-Px requer uma etapa de padronização da concentração de hemoglobina no sedimento eritrocitário para análise posterior. Essa etapa poderia, de

alguma forma, mascarar os resultados em virtude de anemia, por exemplo. Quando o cálculo considerou o valor de GSH-Px/mL de sedimento eritrocitário, a semelhança entre os valores de GSH-Px para os diferentes grupos foi mantida. No entanto, quando considerados os valores inferiores, ficou evidenciado que os mesmos foram para o Grupo Inativa, cerca de 2 vezes menores ao Controle ou Grupo Doença Ativa. Os limites superiores, aparentemente, variaram menos.

Gambhir et al. (1997) analisando o nível de SOD eritrocitário não encontraram diferença entre o Grupo Controle e pacientes com artrite reumatóide, enquanto Banford et al. (1982) reportaram um decréscimo significativo na atividade de SOD eritrocitária em pacientes com AR. O mesmo foi observado por Rister et al. (1978), que sugeriram ser esse aspecto provavelmente um fator importante na patofisiologia na AR e não efeito colateral do tratamento medicamentoso com esteróides, aspirina, D-penicilamina ou azatioprina em crianças com artrite reumatóide.

Tanaseanu et al. (1994) estudaram pacientes com vasculite sistêmica e, além do nível de peroxidação lipídica, analisaram a atividade de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase, concluindo que a atividade das enzimas antioxidantes não muda significativamente ainda que com suplementação de vitamina E.

Serban & Tanaseanu (1994) avaliaram o nível plasmático de peroxidação lipídica em 66 pacientes com vasculite sistêmica auto-imune, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e vasculite sistêmica (VS)] e tratamento com corticóide. O efeito da vitamina E associado a esse tratamento também foi estudado. A mudança do ciclo redox da glutathiona nas células vermelhas e da atividade de glutathiona peroxidase foi analisada em paralelo. Os resultados demonstraram aumento do nível de peroxidação lipídica nos pacientes tratados com corticóides, um incremento explicado pela dislipidemia induzida por esses compostos. A diminuição da concentração de GSH no eritrócito devido ao estresse oxidativo contínuo nesse grupo de doenças foi associada a um aumento concomitante de glutathiona oxidada. O decréscimo de GSH, um substrato para glutathiona peroxidase, induziu, por

consequente, uma inibição da atividade dessa enzima. Tarp et al. (1987) igualmente observaram concentrações reduzidas da enzima glutathiona peroxidase, porém, em pacientes portadores de artrite reumatóide ativa e grave. Esses níveis passaram a ser similares ao do Controle após a suplementação com selênio. Honkanen (1991), por sua vez, estudou os níveis de antioxidantes de glutathiona peroxidase e selênio no plasma de 48 pacientes com artrite reumatóide. A atividade de glutathiona peroxidase não aumentou nos pacientes com AR em geral, porém foi alta naqueles tomando sulfassalazina quando comparados àqueles que não o fizeram.

Jiang & Chen (1992) estudaram 83 pacientes com LES ativo e inativo. Do primeiro grupo, LES ativo, participaram pacientes com ou sem tratamento medicamentoso. Os pesquisadores demonstraram que os níveis de peróxidos de lipídios estavam aumentados enquanto a atividade de SOD estava decrescida. Da fase ativa à inativa, houve um declínio gradual nos níveis de peróxido de lipídio e aumento na atividade de SOD. Túri, et al. (1997) igualmente observaram que a atividade de SOD eritrocitária estava diminuída em pacientes com LES em relação ao Controle.

A inflamação é um processo complexo que envolve vários tipos de células e moléculas, algumas das quais iniciam, amplificam ou sustentam o processo, outras o atenuam e algumas acabam por ter ação antiinflamatória. Aliás, muitas das proteínas de fase aguda têm a capacidade de influenciar um ou mais desses estágios de inflamação (Gabay & Kushner, 1999). As citocinas associadas à inflamação, por exemplo, alteram muitos constituintes hepáticos, incluindo óxido nítrico sintetase, superóxido dismutase contendo manganês e oxigenase heme microsomal (Gabay & Kushner, 1999). Produção aumentada de heme oxigenase e SOD contendo manganês pode limitar a lesão tecidual mediada por oxidantes, enquanto inibidor tecidual de metaloproteinase-1 antagoniza o efeito destrutivo de metaloproteinases (Gabay & Kushner, 1999).

A fase aguda de resposta e inflamação é um processo dinâmico de homeostase que envolve todos os principais sistemas do organismo, em adição aos sistemas imune, cardiovascular e nervoso central. Normalmente,

essa fase de resposta dura apenas alguns poucos dias, no entanto, no caso de inflamação recorrente ou crônica, a continuidade aberrante de alguns aspectos da resposta de fase aguda pode contribuir para incrementar o dano tecidual que acompanha a doença. Um aspecto importante da resposta de fase aguda é a alteração do perfil de biossíntese do fígado. Sob condições normais, o órgão sintetiza uma série de proteínas plasmáticas de forma equilibrada. Muitas dessas proteínas têm funções importantes, e níveis plasmáticos elevados desses reagentes de fase aguda são requeridos durante a resposta, que segue um estímulo inflamatório igualmente agudo. Os reagentes de fase aguda têm uma grande variedade de atividades que contribuem para a defesa do hospedeiro. Eles podem diretamente neutralizar os agentes inflamatórios, ajudar a minimizar a extensão da lesão tecidual, assim como participar no reparo e regeneração do tecido (Steel & Whitehead, 1994).

De acordo com o exposto anteriormente, os dados na literatura relativos a essas enzimas são colidentes e estariam possivelmente relacionados à dificuldade de se avaliar e caracterizar com precisão a ação dessas enzimas na doença inflamatória auto-imune. Portanto, os resultados obtidos não permitem conclusões definitivas sobre o papel da SOD ou da GSH-Px em relação aos grupos estudados embora seja possível supor que vários fatores estejam interagindo.

5.3.2 Vitaminas antioxidantes

5.3.2.1 Vitamina C

É curioso observar que quando os grupos foram comparados em relação ao nível plasmático de ácido ascórbico, atividade da doença em relação ao Controle ou status do processo inflamatório, a diferença entre eles não foi significativa. Deve-se considerar ainda que as medianas dos valores obtidos para todos os grupos sugerem que esse nutriente estava em nível adequado. No entanto, conforme referido no item 5.1.3, indícios existem no sentido de demonstrar que o nível sérico da vitamina C estaria

inversamente relacionado ao valor de SLEDAI ou, mais precisamente, seria afetado pela atividade ou inatividade da doença. Portanto, o nível sérico da vitamina esteve diminuído na vigência da atividade da doença embora esse fenômeno não tenha sido demonstrado pela comparação entre as medianas dos grupos estudados. No entanto, parece importante que a confrontação entre as medianas de ascorbato sérico para os Subgrupos Processo Inflamatório Agudo ou Crônico sem uso de antiinflamatório resultou em diferença estatisticamente significativa (dados não mostrados).

A fase aquosa do plasma contém uma ampla variedade de moléculas com propriedades antioxidantes, entre as quais o ácido ascórbico. Este atua na remoção de vários radicais entre os quais radical superóxido; oxigênio singlete e radical hidroxila. Outra propriedade importante se refere a sua capacidade de regenerar α -tocoferol dos radicais α -tocoferila nas membranas (Gutteridge & Halliwell, 1994). Portanto, o ascorbato plasmático tem uma importância fundamental em proteger os lipídios plasmáticos do ataque das ERO's, ao mesmo tempo em que é rapidamente oxidado quando em contato com oxidantes liberados das células polimorfonucleares (PMNs) ativadas. Essa rápida depleção pode ser a razão do baixo nível plasmático de ascorbato observado por Sahud & Cohen (1971) em pacientes com artrite reumatóide. De fato, Frei et al. (1988), estudando *in vitro* a formação e degradação de hidroperóxidos de lipídios no plasma em relação ao consumo de antioxidantes endógenos, observaram que o ascorbato protege lipídios plasmáticos do dano oxidativo iniciado por radicais peroxila ou células PMNs ativadas. Ao contrário, quando, para a mesma análise, foi empregado o plasma de um indivíduo cuja concentração de ascorbato correspondeu a 140 $\mu\text{mol/L}$ devido à suplementação com vitamina C, a depleção da vitamina, nas mesmas condições, foi incompleta ao mesmo tempo em que não foram detectados hidroperóxidos de lipídios.

O primeiro sintoma ou sinal de deficiência da vitamina é percebido como fadiga e ocorre a uma concentração plasmática inferior a 20 $\mu\text{mol/L}$, desaparecendo quando níveis mais altos são alcançados. Concentração plasmática de 55 a 60 $\mu\text{mol/L}$ é atingida com 100 mg de vitamina C por dia.

Esta concentração é capaz de prevenir por um mês a deficiência da vitamina caso sua ingestão cesse repentinamente durante esse período. A dose limiar de excreção da vitamina C é 100 mg/dia, enquanto o limiar plasmático para a sua excreção é cerca de 55 a 60 $\mu\text{mol/L}$ (Levine, et al., 1999). Certamente, quando considerado um processo de doença, não são claros nem a concentração nem o consumo ideais do nutriente capazes de debelar a enfermidade ou ao menos evitar e/ou prevenir sua exacerbação. Aliás, os dados nesse sentido não são conclusivos e baseiam-se em estudos epidemiológicos.

A concentração de antioxidantes essenciais é determinada pelo seu suprimento dietético. Populações que consomem dietas ricas em frutas, vegetais e grãos tendem, em geral, a apresentar níveis plasmáticos mais elevados de vitaminas C e E, carotenóides e certos flavonóides. Esses indivíduos poderiam ser considerados como de menor risco para o desenvolvimento de câncer e doença cardiovascular (Gey et al., 1993).

5.3.2.2 Alfa-tocoferol plasmático

As médias para os valores de alfa tocoferol plasmático foram normais e similares para todos os grupos estudados, sugerindo não haver deficiência desse nutriente relacionado à doença nem mesmo na dependência da condição de atividade ou *status* do processo inflamatório. Na realidade, a deficiência manifesta de vitamina E ocorre raramente em humanos e nunca como um resultado de deficiência nutricional. Ela pode sim ser resultado de anormalidade genética relacionada à proteína de transferência de tocoferol [α -TTP (α -tocopherol transfer protein)], como um resultado de várias síndromes de má absorção de gordura (Brigelius-Flohé & Traber, 1999) ou abetalipoproteinemia familiar (Wolf, 1994).

Ao contrário de outras vitaminas lipossolúveis, a vitamina E não tem uma proteína carreadora específica e é transportada no plasma por lipoproteínas (Bieri et al., 1983; Kayden & Traber, 1993) e eritrócitos (Traber et al., 1993) e distribuída a outras lipoproteínas (Herrera & Barbas, 2001). Estudos dietéticos indicam que há pequena ou nenhuma diferenciação entre

homólogos de vitamina E no intestino, uma vez que tocoferóis são absorvidos do intestino em micelas, sendo, portanto, sua formação dependente de sais biliares e lipase pancreática. Os homólogos de vitamina E são liberados do enterócito na linfa, dentro de quilomicrons, que subseqüentemente aparecem na circulação onde são catabolizados pela lipase lipoprotéica. Uma vez transportado no fígado há diferenciação entre os homólogos de vitamina E e alfa-tocoferol, sendo esse último o único isômero incorporado com VLDL para secreção no plasma. Os outros isômeros são, na sua maioria, excretados. Os mecanismos envolvidos no acúmulo preferencial de α -tocoferol não são bem compreendidos, no entanto, estudos recentes indicam que as proteínas de transferência de alfa-tocoferol, ao nível intracelular e de membrana, podem estar envolvidas no processo (Dutta-Roy, 1999). São reconhecidas basicamente duas proteínas de transferência de α -tocoferol: 30 kDa e 15 kDa. A primeira, presente no citoplasma do hepatócito, regula a concentração de vitamina E plasmática por incorporar preferencialmente α -tocoferol na VLDL, enquanto a segunda, presente em todos os tecidos, pode ser responsável pela distribuição intracelular de α -tocopherol. A rigorosa especificidade dessas proteínas intracelulares é provavelmente requerida para manter os níveis fisiológicos de α -tocoferol no plasma bem como nas membranas celulares e intracelulares (Dutta-Roy, 1999).

Traber et al., em 1990, apresentaram a primeira evidência de que humanos discriminam entre o alfa-tocoferol RRR de ocorrência natural e a forma SRR. Essa discriminação parece não ocorrer durante a absorção, porém é resultado de um fenômeno pós-absortivo no fígado. Traber et al. (1988) confirmaram que o α -tocoferol recentemente absorvido é secretado pelo intestino em quilomicrons e, subseqüentemente, quilomicrons remanescentes são absorvidos pelo fígado. A vitamina é secretada em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) que, uma vez metabolizadas na circulação, favorecem a transferência simultânea de α -tocoferol para as lipoproteínas de baixa e alta densidade.

A correlação negativa observada entre alfa-glicoproteína e alfa-tocoferol plasmático para os pacientes cuja doença encontrava-se ativa, (n=12; r=-0,59, p=0,045) (dados não mostrados), pode ser sugestiva de uma interação entre o processo inflamatório e a vitamina. De acordo com Grimble, (1997), redução no consumo de vitamina E resulta em aumento nas concentrações de α -ácido glicoproteína e IL6 em ratos submetidos a processo inflamatório induzido por endotoxina. Há de se considerar, no entanto, que tal evidência não é efetivamente clara no presente estudo em razão do valor de α ser muito próximo de 0,05 e também pela similaridade entre os valores de mediana para alfa-glicoproteína entre os grupos classificados de acordo com a atividade da doença. Portanto, qualquer conclusão em relação a esses resultados deve ser cuidadosamente interpretada (Horgan, 2001), não obstante ser esse um dado que merece investigação futura.

5.4 Excreção urinária de α -tocoferol

Conforme referido nos resultados, a excreção urinária de α -tocoferol foi similar para os grupos estudados embora o valor tenha variado quando considerados o Subgrupo cujo processo inflamatório foi definido como agudo. Essa diferença foi estatisticamente significativa em relação ao Subgrupo Processo Inflamatório Crônico.

Convém ressaltar que, para todos os grupos, houve uma variância importante quanto ao total excretado desse elemento através da urina no período de 24 horas e que resultou num coeficiente de variação amplificado. É provável que a coleta da urina de 24 horas realizada num único momento possa ter contribuído para a grande dispersão dos valores. Swanson et al. (1999), analisando em 7 voluntários a excreção de γ -CEHC e a massa correspondente de γ -tocoferol por três dias consecutivos, verificou que a variação relativa à excreção diária total do metabólito foi mais pronunciada entre os indivíduos avaliados que em relação aos dias de coleta individual. Viana (1998) estudou a excreção de α -tocoferol durante 15 dias em ratos submetidos à inflamação aguda e concluiu que esta foi superior para esses

animais em relação ao controle especialmente entre o 10º e 11º dias de início do processo inflamatório. Igualmente a proteinúria foi superior nessa fase. A excreção total de α -tocoferol ao final do período foi, para os animais avaliados, 4 vezes maior em comparação ao controle.

Jordão Jr. et al. (1998) analisaram a excreção urinária de α -tocoferol em pacientes portadores de aids com a doença manifesta ou não e concluíram que a excreção da referida vitamina foi superior para ambos os grupos em relação ao controle. Monteiro et al. (2000), comparando a excreção urinária de α -tocoferol entre pacientes nutridos e pacientes desnutridos, igualmente portadores de aids, observaram que a mesma não diferiu entre os dois grupos estudados.

O metabólito de α -tocoferol, α -CEHC (2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman), resulta do encurtamento da cadeia lateral fitil, enquanto o anel cromano é mantido inalterado, indicando que a vitamina não foi usada para remoção de oxidantes ou radicais (Brigelius-Flohé & Traber, 1999; Schuelke et al., 2000). Schuelke et al. (2000) investigaram a excreção do principal metabólito de α -tocoferol (α -CEHC), em pacientes que apresentavam deficiência de proteína de transferência de α -tocoferol e indivíduos saudáveis. Apesar dos baixos níveis de α -tocoferol plasmático ($< 5 \mu\text{mol/L}$) para os primeiros, a excreção do metabólito foi superior ao observado para o controle não suplementado. De acordo com os dados, o α -tocoferol é incorporado na VLDL de indivíduos saudáveis não suplementados pela ação da proteína de transferência de α -tocoferol e apenas pequena quantidade é degradada e excretada na urina e corresponde a 1 - 3 % do α -tocoferol ingerido (Schuelke et al., 2000). Portanto, a função dessa proteína é selecionar RRR- α -tocoferol das várias formas de vitamina E no fígado e facilitar sua excreção na VLDL nascente (Traber & Arai, 1999).

Ao contrário do que poderia ser esperado, os metabólitos urinários α -CPHC (2,5,7,8-tetramethyl-2-(4'-carboxypentyl)-6-hydroxychroman) e α -CEHC parecem refletir a concentração de α -tocoferol no fígado ao invés de um limiar plasmático desses elementos (Brigelius-Flohé & Traber, 1999;

Schuelke et al., 2000). Suplementação com altas doses da vitamina satura a proteína de transferência de α -tocoferol e o excesso é desviado para sistemas de degradação (Schuelke et al., 2000). Por esse motivo, não são observados incrementos proporcionalmente aumentados de α -tocoferol no plasma de indivíduos normais tratados com doses orais elevadas da vitamina (Herrera & Barbas, 2001). Para os pacientes que apresentam deficiência relacionada à proteína de transferência de α -tocoferol, a vitamina, após atingir o fígado, é degradada (Schuelke et al., 2000).

Os metabólitos de Simon, descritos pela primeira vez em 1956, diferem do α -CEHC pois resultam da abertura do anel cromano e posterior formação de radical α -tocoferoxila, indicando que o α -tocoferol teria exercido sua função antioxidante (Brigelius-Flohé & Traber, 1999).

O fígado é o principal alvo dos mediadores do sistema inflamatório e é também o órgão responsável pela determinação do nível de metabólitos essenciais providos ao organismo durante estágios críticos de estresse. Assim sendo, a resposta do fígado é caracterizada por mudanças proeminentes no transporte de íons e metabólitos, nas atividades da maioria das vias metabólicas e coordenação da estimulação das proteínas plasmáticas de fase aguda (Baumann & Gauldie, 1994). A resposta do fígado ao estímulo inflamatório poderia interferir na excreção de α -tocoferol, podendo estar relacionada à síntese de proteína de transferência de alfa-tocoferol, diminuindo a incorporação desta vitamina nas VLDL e contribuindo portanto para a sua excreção.

Comparando-se as condições relativas à atividade e *status* do processo inflamatório da doença, não é claro que a inflamação aguda precipita a excreção de α -tocoferol ou a torna aumentada. Há indícios, entretanto, de que a última possibilidade possa efetivamente ocorrer, visto que um paciente apresentou excreção cerca de 4 vezes superior à maior excreção observada para o Controle. Como bem demonstrado por Viana (1998), a excreção de α -tocoferol não se dá ao longo do tempo do processo inflamatório mas é pontual. Ou seja, muito possivelmente ela está exacerbada num dado período da evolução do processo inflamatório, motivo

pelo qual não foi possível estabelecer a diferença quando da comparação dos grupos.

As correlações negativas obtidas para a excreção de alfa-tocoferol e SOD para o Grupo Doença Ativa (Figura 12) e o Subgrupo Processo Inflamatório Agudo pressupõem a possibilidade de mecanismos relacionados à defesa antioxidante estarem envolvidos na retenção de alfa-tocoferol. Ou seja, a interdependência entre a excreção de α -tocoferol e o nível de SOD eritrocitário são fenômenos que dependem da ativação da doença e do fato de essa ser aguda, ou seja, de início recente. Passado o período agudo da resposta inflamatória haveria uma tendência de modificação desse padrão uma vez que para o Subgrupo Processo Inflamatório Crônico a correlação não foi verdadeira. O mesmo foi observado para o Grupo Controle. Ou seja, a excreção da vitamina E através da urina é, provavelmente, um fenômeno de ocorrência natural visto ter sido observada para o Controle. No entanto, o fenômeno está alterado no período agudo do processo inflamatório e, possivelmente, seja resultado de um incremento na geração de radicais livres e/ou esteja relacionada à defesa antioxidante.

Portanto, os possíveis efeitos deletérios da excreção da vitamina não são evidentes pois a concentração plasmática de α -tocoferol, para os dois Subgrupos, estava igualmente adequada. Soma-se a isso o fato da peroxidação lipídica estimada através do MDA estar semelhante para ambos os Subgrupos. Ou seja, excreção urinária de vitamina E não culminou com o incremento da peroxidação lipídica.

Acredita-se que a SOD desempenha um dos principais papéis no metabolismo de ERO's. Ela é a primeira enzima envolvida na destruição de radicais de superóxido, que são convertidos em peróxido de hidrogênio, posteriormente metabolizados pela catalase e GSH-Px em sinergia com GSH. As células animais contêm duas formas intracelulares de SOD: a citoplasmática, que contém cobre e zinco; e uma mitocondrial, que contém manganês. Essa enzima pode ser induzida rapidamente em algumas condições como a exposição a um estresse oxidativo de células do

organismo. A SOD contendo cobre e zinco não é influenciada pelo TNF- α , ao contrário da SOD contendo manganês (Delmas-Beauvieux et al., 1996). O método de análise para a SOD utilizado no presente estudo está especialmente relacionado à SOD contendo cobre e zinco, o que significa que, provavelmente, o seu aumento não está relacionado à concentração de TNF- α . Alguns autores, no entanto, têm demonstrado que estresse oxidativo agudo pode induzir ambas as enzimas superóxido dismutase (Delmas-Beauvieux et al., 1996). Waszczykowska et al. (1999), por exemplo, demonstraram que a geração de radical superóxido foi significativamente mais alta para pacientes com LES e que a concentração de TNF- α estava aumentada nesses indivíduos, especialmente antes do tratamento com dexametasona ou prednisona.

A partir das afirmações anteriores, é possível supor que níveis aumentados de radicais superóxido determinem aumento dos níveis plasmáticos de SOD, especialmente no período agudo do processo inflamatório pois a referida enzima tem por principal ação de defesa a dismutação do referido radical. A função da GSH-Px seria degradar o peróxido de hidrogênio formado por essa reação.

Os níveis hepático e plasmático de α -tocoferol não podem ser usados como índices de absorção da vitamina. Provavelmente eles representam diferentes taxas de captação, metabolismo ou *turnover* do α -tocoferol por diferentes órgãos e diferentes circunstâncias (Losowsky et al., 1972). Em condições de aumento do estresse oxidativo, o metabolismo e o *turnover* dos tocoferóis provavelmente aumentam (Pope et al., 2000). Dessa forma, a excreção aumentada de vitamina E através da urina observada para o Subgrupo cujo processo inflamatório encontrava-se agudo poderia ser resultado de uma reação relacionada às proteínas de fase aguda e que se segue como uma tentativa do organismo proteger-se do estresse oxidativo excessivo em razão do processo inflamatório. Inicialmente, a vitamina E seria mobilizada para a corrente sangüínea com o objetivo de atender às necessidades orgânicas de defesa antioxidante. Portanto, o nível plasmático aumentado de α -tocoferol decorrente dessa reação favoreceria a

sua excreção posterior através da urina. A possibilidade de mobilização de α -tocoferol está baseada no estudo de Elsayed (2001) a partir do qual o autor sugere que essa reação seria uma resposta ao estresse oxidativo. Mecanismo de defesa antioxidante relacionado à distribuição de vitamina E no plasma e na hemoglobina foi proposto por Sklodowska et al. (1996), a partir da observação de que pacientes com artrite reumatóide juvenil apresentavam diferença quanto ao total de vitamina E no plasma e na hemoglobina, em favor do último, quando comparados com o Controle. Essa condição foi postulada como resultante de um processo associado com a fase aguda da doença. Parece ainda importante considerar que o corticosteróide por si só favorece a razão de filtração glomerular em indivíduos normais (Quismorio Jr., 1993). No entanto, não é claro que a mesmo ocorra no LES ainda que pudesse representar mais um fator coadjuvante relacionado ao mecanismo proposto de excreção urinária de α -tocoferol.

Excreção urinária de α -tocoferol variável quando analisado o Grupo Doença Inativa em relação ao uso de medicação foi também evento observado, porém, não há, igualmente, indícios de efeito negativo resultante dessa excreção pois os níveis plasmáticos da vitamina foram similares para os Subgrupos analisados bem como o grau de peroxidação lipídica. Quando os resultados de excreção foram analisados individualmente, foi possível verificar que um paciente do grupo apresentou excreção aumentada. Coincidentemente esse mesmo indivíduo demonstrou, por ocasião da internação, quadro associado de infecção. Ainda que a doença não estivesse em atividade certamente o dado merece atenção especialmente porque a presença de infecção concomitante é uma das principais causas de mortalidade no LES (Ruiz-Irastorza et al., 2001).

Tendo por embasamento as considerações sobre a excreção α -tocoferol e/ou seu metabólito, não é possível estabelecer limites de normalidade e/ou adequação em relação aos pacientes estudados.

5.5 Efeito da terapia medicamentosa

A análise da terapia medicamentosa considerou os principais medicamentos utilizados no tratamento do LES, com especial ênfase à prednisona e duas posologias distintas : 5- 10 mg/dia (dose de reposição de cortisona) e superior a 10 mg/dia (antiinflamatório esteróide). Portanto, foram considerados fazendo uso de medicação todos os pacientes para os quais foi prescrito antiinflamatório esteróide, enquanto os demais compuseram o conjunto de pacientes cuja indicação da droga não foi verificada.

Outros medicamentos, embora importantes no tratamento da doença, ou com ação antioxidante semelhante ao corticosteróide, não foram avaliados em separado. Os pacientes que receberam a droga na concentração de 5 a 10 mg/dia apresentaram o maior número de representantes. Desses, 38,46 % fizeram uso de cloroquina concomitantemente. Portanto, a comparação entre os indivíduos de um mesmo grupo considerou, essencialmente, as diferenças quanto à dose de prednisona.

Os dados referentes a essa avaliação sofreram, especialmente para o Grupo Doença Inativa, interferência do pequeno número de pacientes representantes das condições estabelecidas em relação à terapia medicamentosa. Ainda assim, essa análise favoreceu o entendimento e apreciação de parte dos dados destacados anteriormente em relação à atividade da doença.

A observação de diferença quanto ao nível de colesterol plasmático para os pacientes cuja doença estava ativa e para os quais o uso de prednisona foi superior a 10 mg/dia, sugere que a medicação contribui para esse efeito, ainda que peroxidação lipídica não tenha sido incrementada por essa razão, contrariando o que foi verificado por Serban & Tanaseanu (1994). A análise do IMC para os mesmos pacientes e o fato de esse estar normal indica que o antiinflamatório não esteve relacionado ao ganho de peso, muito possivelmente porque a frequência de redução ponderal foi maior para o Grupo Doença Ativa quando comparado ao Grupo Doença Inativa.

Analisando-se os resultados em relação às enzimas antioxidantes, verifica-se que não há evidências de que os níveis de SOD e GSH-Px estejam alterados na dependência do tratamento medicamentoso. No entanto, a análise da atividade das referidas enzimas requer uma etapa de padronização da concentração de hemoglobina no sedimento eritrocitário para análise posterior. Essa etapa poderia, de alguma forma, mascarar os resultados em virtude de anemia, por exemplo. Quando o cálculo se deu em relação ao valor de GSH-Px/mL de sedimento eritrocitário (dados não mostrados), a tendência dos valores de GSH-Px para os diferentes grupos foi mantida. No entanto, para o Subgrupo Processo Inflamatório Crônico, a diferença entre as duas condições relacionadas à droga foi significativa.

A ativação do sistema imune irá exercer estresse sobre a defesa antioxidante do corpo, incluindo enzimas que detoxificam oxidantes (SOD, catalase, glutathione peroxidase e redutase), o tripetídio glutathione, vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol) e ácido úrico. Esse efeito é evidenciado pela formação de peróxido de lipídio em muitos processos de doença e o dano oxidativo é uma resposta na tentativa do sistema imune combater o patógeno invasor pela produção de moléculas oxidativas. Assim, pode-se esperar que a ativação do sistema coincida com um grau de depleção dos componentes da defesa antioxidante (Grimble, 1997). Essas defesas por sua vez são complexas, porém limitam o dano exercido pelas moléculas oxidantes sobre os tecidos. Um número de componentes da defesa antioxidante está aumentado, por ação das citocinas pró-inflamatórias, quando o sistema imune é estimulado. A síntese de glutathione e a atividade de SOD, catalase, glutathione peroxidase e redutase estão igualmente aumentadas. No entanto, um decréscimo em outros componentes da defesa antioxidante também pode ocorrer (Grimble, 1997).

As drogas anti-inflamatórias podem afetar as reações com radicais de diferentes formas, seja por remoção direta de oxidantes como $\text{OH}^\bullet$ e ácido hipocloroso como por inibição da produção de oxidantes por neutrófilos, monócitos e macrófagos. Corticosteróides, agentes antimaláricos e alguns anti-inflamatórios não-esteróides têm demonstrado diminuir a produção de

O_2^- por fagócitos *in vitro*, enquanto a maioria dos corticosteróides são capazes de reagir rapidamente com $OH^\bullet$ (Halliwell et al., 1988). Evidências existem inclusive sugerindo que antimaláricos como cloroquina são ao mesmo tempo antioxidantes (Miyachi, 1986; Yoshiki et al, 1986) e antagonistas de prostaglandinas e que seu modo de ação assemelha-se ao dos glucocorticóides (Yoshiki et al, 1986).

A ação da prednisona na limitação da peroxidação lipídica foi estudada por Tanaseanu et. al. (1994), que avaliaram pacientes com vasculite sistêmica com patogenia auto-imune. Os autores não provaram que a prednisona fosse capaz de alterar o nível de peróxidos nem a atividade das enzimas antioxidantes estudadas. Suryaprabha et al. (1991), em contrapartida, avaliaram a geração de radicais livres, peroxidação lipídica e níveis de ácidos graxos essenciais e seus metabólitos em 19 pacientes com artrite reumatóide e LES, sem tratamento prévio para as referidas doenças ou uso de medicação. Os autores observaram que superóxido e peróxido de hidrogênio estavam aumentados, embora, surpreendentemente, o mesmo não tivesse sido observado em relação à peroxidação lipídica.

Não é possível afirmar, nas condições estudadas, que o tratamento antiinflamatório exerceu efeito protetor do estresse oxidativo para os indivíduos fazendo uso da referida droga, ainda que pareça ser importante a avaliação da medicação em uso, pois é reconhecida a capacidade de medicamentos, inclusive glucocorticosteróides, afetar a peroxidação lipídica e/ou a medida de SOD eritrocitária (Jiang & Chen, 1992). Possivelmente, o antiinflamatório esteróide teria ação auxiliando a redução da produção do radical superóxido, limitando e reduzindo a necessidade das enzimas antioxidantes. Acredita-se que sob medicação a geração aumentada de radicais livres é um processo contínuo que se não combatido pode agravar a doença e, por conseguinte, o estado de saúde. Além disso, os níveis plasmáticos adequados de nutrientes antioxidantes podem contribuir para o controle e/ou redução do estresse oxidativo.

5.6 Comprometimento renal

O LES renal é o mais grave, de prognóstico ruim, especialmente quando acomete indivíduos em idades mais jovens. A insuficiência renal é a segunda principal causa de morte do lúpus (Mills, 1994). A histopatologia que caracteriza a glomerulonefrite favorece a distinção de diferentes padrões da lesão glomerular. Essas anormalidades morfológicas são classificadas de acordo com a OMS em 4 categorias, através das quais é possível obter informações relevantes acerca do prognóstico e tratamento a longo prazo (Lewis, 2001).

As ERO's participam da patogênese de várias doenças renais, incluindo lesões inflamatórias como glomerulonefrite e nefrite intersticial, podendo possivelmente o stresse oxidativo contribuir para a progressão da falência renal. Essas espécies reativas de oxigênio, incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, ácido hipocloroso e peroxinitrito, podem ser geradas por neutrófilos ativados, monócitos e células mesangiais durante os processos metabólicos (Túri et al., 1997).

Portanto, acredita-se que a presença de comprometimento renal no LES possa ser um fator adicional que exacerba o estresse oxidativo e, por essa razão, a presença ou ausência do acometimento renal, independentemente do tratamento medicamentoso, foram consideradas.

A diferença observada para os valores de peroxidação lipídica para o Grupo Doença Ativa, com ou sem comprometimento renal, sugere que, de fato, a gravidade do estresse oxidativo parece ser mais importante quando o envolvimento renal está presente. Assim sendo, há indícios claros de que a presença de comprometimento renal favorece a peroxidação lipídica na condição de Doença Ativa, bem como no período em que o processo inflamatório mostra-se agudo.

Quando analisados os pacientes em relação ao uso da medicação, observa-se que 8 indivíduos (47,06 %), do total de 17 do Grupo Doença Ativa porém com comprometimento renal, estavam fazendo uso de prednisona em proporção superior a 10 mg/dia, contra 3 (37,5 %) pacientes em condição contrária. Assim sendo, é possível afirmar que a medicação não preveniu a peroxidação lipídica nos pacientes com comprometimento

renal. A verificação de correlação positiva entre MDA e proteinúria para o Grupo Doença Ativa ($n= 17$, $r= 0,72$, $p= 0,001$) (Figura 9) reforça a observação de que o envolvimento renal e a peroxidação lipídica aumentada estejam relacionados nessa condição ainda que os níveis de vitamina E plasmática tenham sido adequados e similares para os dois grupos. A verificação de níveis aumentados de MDA em pacientes com glomerulonefrite foi reportada por Templar et al. (1999), indicando que a injúria oxidativa nesse grupo de doentes foi independente do grau de insuficiência renal.

Nível aumentado de peroxidação lipídica em relação ao Grupo Controle foi verificado por Serban et al. (1996), que avaliaram a capacidade de proteção antioxidante e a peroxidação lipídica em 65 pacientes com nefropatia lúpica em relação a um grupo de indivíduos saudáveis. Os autores observaram igualmente correlação entre o grau de peroxidação lipídica e a extensão da proteinúria e que a atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase estava reduzida em relação aos valores de normalidade, ainda que o decréscimo das duas primeiras fosse relativamente compensado pela atividade da última. Além disso, a correlação entre as enzimas estudadas e a proteinúria não foi verdadeira. Dos dados obtidos, foi concluído que a grande variação individual relacionada aos valores resultou do caráter multifatorial da doença bem como das respostas metabólicas específicas individuais e pela possível existência de mecanismos relacionados ao início da doença renal.

Em relação às enzimas antioxidantes, se destacou a SOD para o Grupo Doença Inativa uma vez que sua concentração foi diferente para as duas situações analisadas, indicando capacidade antioxidante alterada em decorrência da presença ou ausência de comprometimento renal. A importância desse achado em relação ao estresse oxidativo não é clara uma vez que a peroxidação lipídica medida pelo MDA não foi diferente para as duas condições ou, ao contrário, indica justamente que a alteração da atividade das enzimas antioxidantes representa proteção extra, motivo pelo qual os índices de peroxidação lipídica não se mostraram diferenciados. De acordo com Delmas-Beauvieux et al. (1996), a GSH-PX e a SOD

primeiramente aumentem sob lipoperoxidação via uma resposta adaptativa similar àquela da SOD e então a atividade de GSH-PX decresce como um resultado de seu consumo.

A hipótese de que após um processo inflamatório os glomérulos possam adquirir o potencial de proteger-se da ativação e lesão foi proposta por Kitamura & Fine (1999) a partir do princípio de que o balanço entre os fatores locais de injúria e os mecanismos de defesa no glomérulo determina a progressão ou resolução da injúria da doença glomerular. A análise da GSH-Px no eritrócito não permite, no entanto, caracterizar que os níveis plasmáticos estariam relacionados à capacidade de defesa do glomérulo.

Estabelecer o envolvimento de radicais livres na patogênese de uma doença é extremamente difícil (Zwart et al., 1999). Nesse sentido, não resta dúvida de que os dados obtidos para os pacientes estudados foram bastante variáveis, não permitindo, portanto, conclusões contundentes a partir das quais seja possível fundamentar a relação da doença com o sistema de defesa antioxidante. A divergência de dados, não somente relativa aos experimentos conduzidos, mas igualmente referidos na literatura, ilustra a dificuldade em se conduzirem estudos clínicos que envolvam o LES. Essa dificuldade relacionada aos pacientes portadores de LES foi observada por Davidson & Diamond (2001), que relacionaram como principais causas a grande variedade de manifestações da doença somada à natureza da mesma no que tange à alternância de estados de recidiva e remissão. A falta de um critério padrão que caracterize efetivamente a remissão da doença foi igualmente apontada.

6 CONCLUSÕES

1. A peroxidação lipídica não aumentou em consequência da atividade da doença ou *status* do processo inflamatório. Porém mostrou-se maior na presença de acometimento renal, quer em razão da atividade da doença e conseqüente proteinúria, como em razão da condição de processo inflamatório agudo.
2. A concentração plasmática de vitamina C decresceu em razão da atividade da doença e não dependeu do grau de atividade do Lúpus Eritematoso Sistêmico aferido através do SLEDAI.
3. A alteração da concentração das enzimas antioxidantes ou da capacidade protetora delas não foi evidente em relação à atividade da doença ou ao *status* do processo inflamatório, ainda que a excreção de α -tocoferol esteja de alguma forma relacionada com os níveis plasmáticos de SOD na fase aguda do processo inflamatório.
4. A oxidação aumentada de proteínas não foi um fenômeno comprovado embora a variabilidade dos resultados possa refletir a dificuldade de se analisar esse parâmetro.
5. Incremento relacionado ao dano oxidativo de DNA não foi observado nas condições do experimento.

6. A excreção urinária de α -tocoferol foi um evento independente da presença de acometimento renal ou da atividade da doença e, mesmo que mais pronunciada na fase aguda do processo inflamatório, não contribuiu para a redução da concentração plasmática da referida vitamina. A peroxidação lipídica, também, não se mostrou alterada, reforçando a idéia de que a excreção urinária da vitamina E não culminou com o incremento do estresse oxidativo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J. SCMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 307, n. 1, p. 261-271, May 1994.

ARUOMA, O . I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chemical Toxicology**, Exeter, v. 32, n. 7, p.671-683, Jul. 1994.

BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **Journal of Clinical Investigation**, New York (NY), v. 52, n. 3, p. 741-744, Mar. 1973.

BANFORD, J. C.; BROWN, D. H.; HAZELTON, C. J.; McNEIL, C. J.; STUROCK, R. D.; SMITH, W. E. Serum copper and erythrocyte superoxide dismutase in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Disease**, London, v. 41, n. 5, p . 458-462, Oct. 1982.

BARR, S. G.; ZONANA-NACACH, A.;MAGDER, L. S.; PETRI, M. Patterns of disease activity in systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, Philadelphia (PA), v. 42, n. 12, p. 2682-2688, Dec. 1999.

BASHIR, S.; HARRIS, G.; DENMAN, M. A.; BLAKE, D. R.; WINYARD, P. G. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 52., n. 9, p. 659-666, Sep. 1993.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, Barking, v. 15, n. 2, p. 74-80, Feb. 1994.

BAZINET, P.; MARIN, G. Malabsorption in Systemic Lupus Erythematosus. **Digestive diseases**, Basel, v . 16, n. 5, p .460 - 466, May, 1971.

BENDICH, A . Antioxidant Nutrients and Immune Functions Introduction -. In: BENDICH A. et. al. (Ed.) **Antioxidant nutrients and immune functions**. New York: Plenum Press, 1990. cap. 1, p. 1-12.

BEUTLER, E.; BLUME, K. G.; KAPLAN, J. C.; LOHR, G. W.; RAMOT, B.; VALENTINE, W. N. International committee for standardization in haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 35, n. 2, p.331-340, Feb. 1977.

BIEMOND, P.; SWAAK, A. J. G.; VANEIJK, H. G.; KOSTER, J. F. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. **Free radical biology and Medicine**, Tarrytown (NY), v. 4, n. 3, p. 185-198, 1988.

BIERI, J. G. ; LAURENCE, C.; HUBBARD, V. S. Medical uses of vitamin E. **New England Journal of Medicine**, Boston (MA), v. 308, n. 18, p. 1063-1071, May 1983.

BLOUNT, S.; GRIFFITHS, H. R.; LUNEC, J. Reactive oxygen species induce antigenic changes in DNA. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 1-2, p. 100-104, Mar. 1989.

BOMBARDIER, C. GLADMAN D. D.; UROWITZ M.; CARON D.; CHANG, C. H. Derivation of the SLEDAI. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. **Arthritis and Rheumatism**, Philadelphia (PA), v. 35, n. 6, p. 630-640, Jun. 1992.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M. G. Vitamin E: function and metabolism. **FASEB Journal**, Bethesda (MD), v. 13, n. 10, p. 1145 - 1155, Jul. 1999.

BUEGE, J. A . AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York (NY), v. 52, p. 302-310, 1978.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. Part I. Chemistry and antioxidant functions. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York (NY), v. 570, p. 7-22, 1989.

CHANCE, B.; SIES H.; BOVERIS, A . Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological reviews**, Bethesda (MD), v. 59, n. 3, p. 527 - 605, Jul. 1979.

CHEVION, M.; BERENSHETEIN, E.; STADTMAN, E. R. Human Studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as marker of damage. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 33, suppl, p. S99-108, Nov. 2000.

COLLINS, A . R.; DOBSON, V.L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us ? **Mutation Research**, Amsterdam, v. 375, n. 2, p. 183-193, Apr. 1997.

_____. DNA oxidation, antioxidants and cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 385-389, Dec.1998.

COMSTOCK, G. W.; BURKE, A.E.; HOFFMAN, S. C.; HELZLSouer, K. J.; BENDICH, A.; MASI, A.T.; NORKUS, E. P.; MALAMET, R. L.; GERSHWIN, M. E. Serum concentrations of α tocoferol, β carotene, and retinol preceding the diagnosis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 56, n. 5, p. 326-325, May 1997.

COURTNEY, P. A.; CROCKARD, A. D.; WILLIAMSON, K.; IRVINE, A.E.; KENNEDY, R. J.; BELL, A. L. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 58, n. 5, p. 309 - 314, May 1999.

DAVIDSON, A.; DIAMOND, B. Autoimmune Diseases. **New England Journal of Medicine**, Boston (MA), v. 345, n. 5, p. 340 - 350, Aug. 2001.

DELMAS-BEAUVIEUX, M-C; PEUCHANT, E.; COUCHOURON, A.; CONSTANS, J.; SERGEANT, C.; SIMONOFF, M.; PELLEGRIN, J. L.; LENG, B.; CONRI, C.; CLERC, M. The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: effects of supplementations with selenium or β -carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda (MD), v. 64, n. 1, p.101-107, Jul. 1996.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VINA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**., London, v. 80, suppl. 1, S77-S112, Aug. 1998.

DUTHIE, S. J.; et. al. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 393, n. 3, p. 223-231, Oct. 1997.

DUTTA-ROY, A K. Molecular Mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of α -tocopherol: Role of Tocopherol-binding proteins. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 37, n. 9-10, p. 967-971, Sep./Oct. 1999.

ELSAYED, N. M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. **Nutrition**, Tarrytown (NY), v. 17, n. 10, p. 828-834, Oct. 2001.

FRANZ, M. J.; BARR, P.; HOLLER, H.; POWERS, M. A. ; WHEELER, M. L.; WYLIE-ROSETT, J. Exchange lists: revised 1986. **Journal of the**

American Dietetic Association. Chicago (IL), v. 87, n. 1, p. 28-34, Jan. 1987.

FREI, B. Reactive oxygen species and autoxidant vitamins: Mechanisms of action. **American Journal of Medicine**, New York (NY), v. 97 (suppl. 3 A), p.3A-13S, Sep. 1994.

_____; McCALL, M. K.; Antioxidant vitamins: evidence from biomarkers in humans. In: WALTER, P.; HORNIG, D.; MOSER U.(Ed.): **Functions of Vitamins beyond Recommended Dietary Allowances**. Bibl. Nutr. Dieta. Basel: Karger, 2001, n. 55, p. 46-67.

_____; STOCKER, R.; AMES, B. N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington (DC), v. 85, n. 24, p. 9748-9752, Dec. 1988.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York (NY), v. 893, p. 13-18, 1999.

FUKUNAGA, K.; TAKAMA, K.; SUZUKI, T. High performance liquid chromatographic determinations of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. **Analytical Biochemistry**, Orlando (FL), v. 230, n. 1, p.20-23, Sep. 1995.

GABAY, C., KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine**, Boston (MA), v. 340, n. 6, p.448-454, Feb. 1999.

GAMBHIR J. K.; LALI P.; JAIN A. K.. Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, Tarrytown (NY), v. 30 n. 4, p. 351-355, Jun. 1997.

GEY K. F.; MOSER, U. K.; JORDAN, P.; STAHELIN, H. B.; EICHHOLZER, M.; LUDIN, E. Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda (MD), v. 57 (suppl. 5), p. 787S-797S, May 1993.

GREEN, M. H.; LOWE, J. E.; WAUGH, A. P.; ALDRIDGE, K. E.; COLE, J.; ARLETT, C. F. Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 316, n. 2, p. 91 - 102, Aug. 1994.

GRIMBLE, R. F. Effect of antioxidant vitamins on immune function with clinical applications. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 67, n. 5, p. 312-320, Jun. 1997.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL B. Antioxidants: elixirs of life or media hype ? In: _____. **Antioxidants in Nutrition, Health and Disease**. Oxford: Oxford University Press, 1994a. cap. 3, p 40-62.

_____; _____ Oxygen, the breath of life or oxygen, the first toxic oxidizing air pollutant. In: _____. **Antioxidants in Nutrition, Health and Disease**. Oxford: Oxford University Press, 1994b. cap. 1, p 1-16.

HALLIWELL, B. AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 33, n. 7, p. 601-617, Jul. 1995.

_____; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radical, antioxidants, and human disease: Where are we now ? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St Louis (Mo), v. 119, n. 6, p.598-620, Jun. 1992.

_____. Free radical, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence ? **Lancet**, London, v. 344, n. 8942, p.721-724, Sept. 1994.

_____; HOULT, J. R.;BLAKE, D. R. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. **FASEB Journal**, Bethesda (MD), v. 2, n. 13, p. 2867 - 2873; Oct. 1988.

_____. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB Journal**, Bethesda (MD), v. 1, n. 5, p. 358-364, Nov. 1987.

HELIÖVAARA M.; KNEKT, P.; AHO, K.; AARAN, R. K.; ALFTHAN, G.; AROMAA, A. Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 53, n. 1, p.51-53, Jan. 1994.

HELLMAN, B.; VAGHEF, H.; BOSTRÖM, B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 336, n. 2, p. 123-131, Mar. 1995.

HERRMANN, M. VOLL., R. E.; KALDEN, J. R. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Immunology today**, Barking, v. 21, n. 9, p. 424-426, Sep. 2000.

HERRERA E.; BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 57, n.2 , p. 43 - 56, Mar. 2001.

HERRICK, A . L.; WORTHINGTON, H.; RIELEY, F.; CLARKE, D.; SCHOFIELD, D.; BRAGANZA, J. M.; JAYSON, M.I. Dietary intake of micronutrient antioxidants in relation to blood levels in patients with sistemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 23, n. 4, p.650-653, Apr. 1996.

HONKANEN, V. E. The factors affecting plasma glutathione peroxidase and selenium in rheumatoid arthritis: a multiple linear regression analysis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, Oslo, v. 20, n. 6.. p. 385 - 391, 1991.

HORGAN, G. W. Statistical analysis of nutritional studies. **British Journal of Nutrition**, London, v. 86, n. 2, p. 141-144, Aug. 2001.

HUGHES D. A . Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 58, n.1, p-79-84, 1999.

JACOB, R. A .; BURRI B. J. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinincal Nutrition**, Bethesda (MD), v. 63, n. 6, p.985S-990S, Jun. 1996.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown (NY), v. 9, n.6, p. 515-540, 1990.

JIANG, X.; CHEN, F. The effect of lipid peroxides and superoxide dismutase on Systemic Lupus Erythematosus: A preliminary study. **Clinical Immunology and Immunopathology**, Orlando (FL), v. 63, n. 1, p. 39-44, Apr. 1992.

JORDÃO Jr., A . A.; SILVEIRA S, FIGUEIREDO JF, VANNUCCHI H. Urinary excretion and plasma vitamin E levels in patients AIDS. **Nutrition**, Tarrytown (NY), v. 14, n. 5, p. 423-426, May 1998.

KALUNIAN, K. C. Definition, classification, activity and damage indices. In: VALLACE, D. J.; HAHN, H. B. (ed.) **Duboi's lupus erythematosus**, 5 ed. Williams & Wilkins, Baltimore, chapter 2, p. 19-29, 1997.

KARLSSON, J. Principles of radical formation. In: _____. **Antioxidants and exercise**. Champaign: Human Kinetics, 1997. cap. 3, p.25 -37.

KAYDEN, H. J.; TRABER, M. G. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. **Journal of Lipid Research**, Bethesda (MD), v. 34, n. 3, p. 343 - 358, Mar. 1993.

KEHRER, J. P. and SMITH, C. V. Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: FREI, B. **Natural antioxidants in human health and disease**. San Diego: Academic Press, 1994. cap. 2, p.25-62.

KIMBERLY, R. P. Prospects for autoimmune disease: Research advances in systemic lupus erythematosus. **Journal of the American Medical Association**, Chicago (IL), v. 285, n. 5, p. 650-652, Feb. 2001.

KITAMURA, M.; FINE, L. G. The concept of glomerular self-defense. **Kidney International**, Cambridge (MA), v. 55, n 5; p. 1639 - 1671, May 1999.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Renal physiology. Glomerular Filtration and renal blood flow. In: _____. **Renal Physiology**, 2 ed., St. Louis: Mosby, 1997. cap. 3, p. 31-51.

KUSHNER, I. The acute phase response: an overview. **Methods in enzymology**, New York (NY), v. 163, p. 373 - 383, 1988.

LAHITA, R. G. The clinical presentation of systemic lupus erythematosus. In: _____(ed.). **Systemic lupus erythematosus**. 3 ed. Academic Press, San Diego, cap. 18, p. 325-336, 1999.

LEVINE, M.; RUMSEY, S. C.; DARUWALA, R.; PARK, J. B.; WANG, Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. **Journal of the American Medical Association**, Chicago (IL), v. 281, n. 15, p. 1415-1423, Apr. 1999.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, New York (NY), v. 186, p. 464-478. 1990.

LEWIS, E. J.; SCHWARTZ, M. M.; KORBET, S. M. Severe lupus nephritis; importance of re-evaluating the histologic classification and the approach to patient care. **Journal of Nephrology**, Milano, v. 14, n. 4, p. 223-227, Jul.-Aug. 2001.

LOSOWSKY, M. S.; KELLEHER, J.; WALKER, B.E.; DAVIES, T.; SMITH, C. L. Intake and absorption of tocopherol. **Annals New York Academy of Sciences**, New York (NY), v. 203, p. 212-222, Dec. 1972.

LUNDBERG, A. C.; AKESSON A.; AKESSON B. Dietary intake status in patients with systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 51, n. 10, p. 1143-1148, Oct. 1992.

MACHLIN, L. J. (Ed.). Vitamin E. In: _____. **Handbook of vitamins**. New York: Marcell Dekker, 1991. cap. 3, p. 99-144.

MADER, R.; ADAWI, M.; SCHONFELD, S. Malabsorption in systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Rheumatology**, Pisa, v.15, n. 6, p. 659-661, Nov./Dec. 1997.

McCORD, J. M. Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation. **Journal of Free Radicals in Biology and Medicine**, New York (NY), v. 2, n. 5-6, p. 307-310, 1986.

McCURDY, D.; TAI, L. Q.; FRIAS, S.; WANG, Z. Delayed repair of DNA damage by ionizing radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Radiation Research**, Charlottesville (VA), v. 147, n. 1, p. 48 - 54, Jan. 1997.

MCKELVEY-MARTIN, V.J.; GREEN, M. H.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL B. L.; DE MEO M. P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 288, n. 1, p. 47 - 63. Jul. 1993.

MEYDANI S. N.; BEHARKA, A. A. Recent developments in vitamin E and immune response. **Nutrition Reviews**, (Washington (DC), v. 56, n 1, S49-S58, Jan. 1998.

MICHEL, P.; EGGERT, W.; ALBRECHT-NEBE, H.; GRUNE, T. Increased lipid peroxidation in children with autoimmune diseases, **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 86, n. 6, p. 609-612, Jun. 1997.

MILLS, J. A. Systemic Lupus Erythematosus. **New England Journal of Medicine**, Boston (MA), v. 330, n. 26, p. 1871 - 1879, Jun. 1994.

MIYACHI, Y.; YOSHIOKA, A.; IMAMURA, S.; NIWA, Y. Antioxidant action of antimalarials. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 45, n. 3, p. 244-248, Mar. 1986.

MOHAN, I. K.; DAS, U. N. Oxidant stress, anti-oxidants and essential fatty acids in systemic lupus erythematosus. **Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 56, n. 3. p. 193 -208, Mar. 1997.

MONTEIRO, J. P.; CUNHA, D. F. da; CUNHA, S. F. C., SANTOS V. M. dos; JORDÃO Jr., A. A.; CORREIA, D.; SILVA-VERGARA, M. L.; VANNUCCHI, H.; JUNIOR, V.R.; BIANCHI, M. L. P. Nutritional assessment of vitamin E in Malnourished patients with AIDS. **Nutrition**, Tarrytown (NY), v. 16, n. 5, p. 339-343, May 2000.

MORRISSEY, P. A.; SHEELHY, P.J.A. Optimal nutrition; vitamin E. **Proceedings of the Nutrition Society**. London, v. 58, n. 2, p. 459-468, May 1999.

MUNRO, R.; CAPELL, H. Prevalence of low body mass in rheumatoid arthritis: association with the acute phase response. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 56, n. 5, p.326-329, May 1997.

NIKI,E. Free radicals in the 1900's: from in vitro to in vivo. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 33, p. 693-704, Dec. 2000.

NOGUCHI, N.; WATNABE, A.; SHI, H. Diverse functions of antioxidants. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 33, n. 6, p. 809-817, Dec. 2000.

ODETTI, P.; GARIBALDI, S.; GURRERI, G.; ARAGNO, I.; DAPINO, D.; PRONZATO, M. A.; MARINARI, U. M. Protein oxidation in hemodialysis and kidney transplantation. **Metabolism: Clinical and Experimental**, Duluth (MN), v. 45 n. 11, p. 1319 - 1322, Nov., Nov. 1996.

OLDHAM, K. M.; BOWEN P. Oxidative stress in critical care: Is antioxidant supplementation beneficial ? **Journal of the American Dietetic Association**. Chicago (IL), v. 98, n. 9, p. 1001-1008, Sep. 1998.

PANAYIOTIDIS, M.; COLLINS, A. Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 27, n. 5, p.533-537, Nov. 1997.

PATAVINO, T.; BRADY, D. M. Natural medicine and nutritional therapy as an alternative treatment in systemic lupus erythematosus. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, Dover, vol. 6, n. 5, Oct. 460 - 471, 2001

POLIDORI M.C.; FREI, B.; CHERUBINI, A.; NELLES, G.; RORDORF, G.; KEANEY Jr., J. F.; SCHWAMM, L.; MECOCCHI, P.; KOROSHETZ, W. J.; BEAL, M.F. Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown (NY), v. 25, n. 4-5, p. 561-567, Sep. 1998.

POLLAK, V. E.; PIRANI, C. Lupus Nephritis. Pathology, Pathogenesis, clinicopathologic correlations and prognosis. In: WALLACE, D. J.; HAHN, H. B. **Dubois' Lupus Erythematosus**. 4 ed. Pennsylvania: Lea & Febiger Malnenm, 1993. cap. 53, p. 525 - 541.

POPE, S. A.; CLAYTON, P. T.; MULLER, D. PP. R. A new method for the analysis of urinary vitamin E metabolites and the tentative identification of a novel group of compounds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York (NY), v. 381, n. 1, p 8-15, Sep., 2000.

PRYOR, W. A. Oxidants and antioxidants. Free radicals and lipid peroxidation: what they are and how they got that way. In: FREI, B. **Natural antioxidants in human Health and disease**, San Diego: Academic Press, 1994. cap. 1, p. 1-24.

QUISMORIO Jr., F. P. Systemic corticosteroid therapy in Systemic Lupus Erythematosus. In: WALLACE, D. J.; HAHN, H. B. **Dubois' Lupus Erythematosus**, 4 ed, Pennsylvania: Lea & Febiger Malnenm, 1993, p. 574 - 587.

REAVEN, P. D. WITZTUM J. L. The role of oxidation of LDL in atherogenesis. **The endocrinologist**, Baltimore, v. 5, n. 1, p. 44-54, 1995.

REDDANNA, P.; WHELAN, J.; BURGESS, J. R.; ESKEW, M. L.; et al. The role of vitamin E and selenium on arachidonic acid oxidation by way of the 5-lipoxygenase pathway. **Annals New York Academy of Sciences**, New York (NY), v. 570, p. 136-145, 1989.

RENKE, J.; POPADIUK, S.; KORZON, M.; et al. Protein carbonyl groups content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. **Free Radical biology and Medicine**, v. 29, n 2, p. 101-104, Jul. 2000.

RISTER, M.; BAUERMEISTER, K.; GRAVERT, U.; GLADTKE, E. Superoxide-dismutase deficiency in rheumatoid arthritis. **Lancet**, London, v. 1, n. 8073, p. 1094, May 1978 - letter.

ROCK, C. L.; JACOB R. A.; BOWEN P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**. Chicago (IL), v. 96, n. 7, p.693-702, Jul. 1996.

RUIZ-IRASTORZA G.; KHAMASHTA, M. A.; CASTELLINO, G.; HUGHES, G.R. Systemic Lupus erythematosus. **Lancet**, London, v. 357, n. 9261, p. 1027-1032, Mar. 2001.

SAHUD, M. A.; COHEN R. J. Effects of aspirin ingestion on ascorbic acid levels in rheumatoid arthritis. **Lancet**, London, v. 1, n. 7706, p. 937-938, May 1971.

SCHUELKE, M.; ELSNER, A.; FINCKH, B.; KOHLSCHUTTER, A.; HUBNER, C.; BRIGELIUS-FLOHE, R. Urinary α -tocopherol metabolites in α -tocopherol transfer protein-deficient patients. **Journal of Lipid Research**, Bethesda (MD), v. 41: n. 10, p. 1543-1551, Oct. 2000.

SERBAN, M. G.; TANASEANU, S.; BARA, C. Oxidant stress and antioxidant protection in lupus nephropathy. **Romanian Journal of Internal Medicine**, Bucuresti, v. 34, n. 1-2, p. 105-109, Jan.-Jun. 1996.

_____; _____. Lipid peroxidation in autoimmune systemic vasculitides. Effect of corticoid treatment on lipid peroxidation. Antioxidant protection with vitamin E. **Romanian Journal of Internal Medicine**, Bucuresti, v. 32, n. 2, p. 137 - 142, Apr./Jun. 1994.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, Beta-carotene, and other carotenoids, **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 669, p. 7-20, Sep. 1992.

SIMON, E. J.; EISENGART, A.; SUNDHEIM, L.; MILHORAT, A. T. The metabolism of vitamin E. II. Purification and characterization of urinary metabolites of α -tocopherol. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore (MD), v. 221, p. 807-817, 1956.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Orlando (FL), v. 175, n.1, p. 184-191, Mar. 1988.

SITUNAYAKE, R. D.; THURNHAM, D. I.; KOOTATHEP, S.; CHIRICO, S.; LUNEC, J.; DAVIS, M.; MCCONKEY, B. Chain breaking antioxidant status in rheumatoid arthritis: clinical and laboratory correlates. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 50, n. 2, p. 81-86. Feb. 1991.

SKLODOWSKA, M.; GROMADZINSKA, J.; BIERNACKA, M.; WASOWICZ, W.; WOLKANIN, P.; MARSZALEK, A.; BROZIK, H.; POKUSZYNSKA, K. Vitamin E, thiobarbituric acid reactive substance concentrations and superoxide dismutase activity in the blood of children with juvenile rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**. Pisa, v. 14: n. 4, p. 433-439, Jul.-Aug.1996.

SRÁM, R. J.; PODRAZILOVA K.; DEJMEK J.; MRACKOVA G.; PILCIK T. Single cell gel electrophoresis assay; sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. **Mutagenesis**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 99-103, Jan. 1998.

STADTMAN, E. R.; Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radical biology and Medicine**, Tarrytown (NY), v. 9, n. 4, p. 315-325, 1990.

STEEL, D. M.; WHITEHEAD, A. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunology Today**. Barking, v. 15, n. 2, p. 81-88, Feb. 1994.

SURYAPRABHA, P.; DAS U. N.; RAMESH, G.; KUMAR, K. V.; KUMAR, G. S. Reactive oxygen species, lipid peroxides and essential fatty acids in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids**. Edinburgh, v. 43, n. 4, p. 251-255, Aug. 1991.

SWAAK, A. J. van den BRINK, H. G.; SMEENK, R. J.; MANGER, K.; KALDEN, J.R.; TOSI, S.; DOMLIJAN, Z.; ROZMAN, B.; LOGAR, D.; POKORNY, G.; KOVACS, L.; KOVACS, A.; VLACHOYIANNPOULOS, P. G.; MOUTSOPOULOS, H. M.; CHWALINSKA-SADOWSKA, H.; KISS, E.; CIKES, N.; ANIC, B.; SCHNEIDER, M.; FISCHER, R.; BOMBARDIERI, S.; MOSCA, M.; GRANINGER, W.; SMOLEN, J. S. Systemic lupus erythematosus. Disease outcome in patients with a disease duration of at least 10 years: second evaluation. **Lupus**, Houndmills, v. 10, n. 1, p. 51-58, 2001.

SWANSON, J. E.; BEN R. N.; BURTON, G. W.; PARKER, R. S. Urinary excretion of 2,7,8-trimethyl-2-(β -carboxyethyl)-6-hydroxychroman is a major

route of elimination of γ -tocopherol in humans. **Journal of Lipid Research**, Bethesda (MD), v. 40, n. 4, p. 665-671, Apr. 1999.

TANASEANU S.; SERBAN M. G.; NITA V. Lipid peroxidation and the activity of some antioxidant enzymes in patients with systemic vasculitides treated with corticoids. **Romanian Journal of Internal Medicine**, Bucuresti. v. 32 n.1 p. 47-50, 1994.

TARP U.; HANSEN, J. C.; OVERVAD, K.; THORLING, E. B.; TARP, B. D.; GRAUDAL, H. Glutathione peroxidase activity in patients with rheumatoid arthritis and in normal subjects: effects of long-term selenium supplementation. **Arthritis and Rheumatism**, Philadelphia (PA), v. 30, v. 10. p. 1162-1166, Oct. 1987.

TEMPLAR, J.; KON, S. P.; MILLIGAN, T. P. NEWMAN, D. J.; RAFTERY, M. J. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 946-951. Apr. 1999.

TICE, R. & VASQUEZ, M. ILS. The pH > 13 alkaline SCG Assay protocol for the application of the pH > 13 alkaline single cell gel (SCG) Assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. 08/30/99 revised
Disponível em: <http://www.cometassay.com/>. Acesso em: 1999.

TRABER, M. G.; BURTON G. W.; INGOLD, K. U.; KAYDEN, H. J. RRR- and SRR- α -tocopherols are secreted without discrimination in human chylomicrons, but RRR- α -tocopherol is preferentially secreted in very low density lipoprotein. **Journal of Lipid Research**. Bethesda (MD), v. 31, n. 4, p. 675 - 685, Apr. 1990.

_____; COHN, W.; MULLER, D. P. R. Absorption, transport and delivery to tissues. In: PACKER, L.; FUCHS, J. (Ed.). **Vitamin E and Disease**. New York: Marcel Dekker, 1993. cap. 3, p. 35-51.

_____; INGOLD K. U.; BURTON, G.W.; KAYDEN, H. J. Absorption and transport of deuterium-substituted 2R,4'R,8R- α -tocopherol in human lipoproteins. **Lipids**, Champaign (IL), v. 23: n 8, p. 791-797, Aug. 1988.

_____; ARAI, H. Molecular mechanisms of vitamin E transport. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto (CA), v. 19, p. 343-355, 1999.

TÚRI, S.; NEMETH, I.; TORKOS, A.; SAGHY, L. VARGA, I.; MATKOVICS, B.; NAGY, J. Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases. **Free radical biology and Medicine**, Tarrytown (NY), v. 22, n. 1-2, p. 161-168, 1997.

VIANNA, S. M. L. **Estudo da peroxidação lipídica e excreção urinária de α -tocoferol em ratos submetidos a processos inflamatórios de caráter**

imunológico. 1998. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

WALPORT, M. J. Complement. Second of two parts. **New England Journal of Medicine**, Boston (MA), v. 344, n. 15, p. 1140 - 1144., Apr. 2001.

WASZCZYKOWSKA, E.; ROBAK E.; WOZNIACKA A.; NARBUTT J.; TORZECKA J. D.; SYSA-JEDRZEJOWSKA A. Estimation of SLE activity based on the serum level of chosen cytokines and superoxide radical generation. **Mediators of Inflammation**, Abingdon Oxforshire, v. 8, n.2, p. 93-100, 1999.

WHO EXPERT COMMITTEE ON PHYSICAL STATUS: Overweight adults. In: _____ **The use and interpretation of anthropometry**. Geneve, 1995. cap. 7, p. 312-344.

WOLF G. Structure and possible function of an alpha-tocopherol-binding protein. **Nutrition Reviews**, (Washington (DC)), v. 52, n. 3 p. 97-98, Mar. 1994.

WONG, S. H.; KNIGHT J. A.; HOPFER, S. M.; ZAHARIA, O.; LEACH Jr., C. N.; SUNDERMAN Jr., F. W. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde - thiobarbituric acid adduct. **Clinical Chemistry**, Washington (DC), v.33, n. 2 (Pt 1), p.214-220, Feb. 1987.

YOSHIKI, M. et al. Antioxidant action of antimalarials. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 45, n. 3, p. 244 - 248, March 1986.

de ZWART L. L.; MEERMAN J. H.; COMMANDEUR, J. N.; VERMEULEN, N.P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free radical biology and Medicine**, Tarrytown (NY), v. 26, n .1-2, p. 202-226, Jan. 1999.

ZIMMER, S; STOCKER, A.; SARBOLOUKI, M. N.; SPYCHER, S. E.; SASSOON, J.; AZZI, A. A novel Human Tocopherol-associated protein. Cloning, in vitro expression, and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 33, p. 25672-25680, Aug. 2000.

RESUMO

ROCCO, C. S. **Peroxidação lipídica e antioxidantes no Lúpus Eritematoso Sistêmico**. 2002. 131 p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP.

O estresse oxidativo está relacionado ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e é provável que o desequilíbrio entre a geração de radicais livres e antioxidantes esteja envolvido com o agravamento do estado de saúde. **Objetivo:** Estudar a peroxidação lipídica e componentes de defesa antioxidante no LES. **Casuística e métodos:** Foram estudados 54 pacientes com LES, separados em dois grupos: Grupo Doença Ativa (n=25) e Grupo Doença Inativa (n=29) e 12 Controles. Para o Grupo Doença Ativa, dois subgrupos foram constituídos considerando o *status* do processo inflamatório: Agudo e Crônico. Foi analisada a oxidação de lipídios [malondialdeído (MDA)]; de proteínas (grupo carbonila) e de DNA (Teste do Cometa). A defesa antioxidante foi quantificada por superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), α -tocoferol plasmático e vitamina C plasmática. A excreção urinária de α -tocoferol foi igualmente determinada. Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e referidos como mediana e valores mínimos e máximos. **Resultados:** Os níveis de MDA não diferiram entre os grupos e corresponderam a 0,71 (0,30-1,81); 0,61 (0,11-1,82) e 0,53 (0,34-1,04) $\mu\text{mol/L}$ para os grupos Doença Ativa, Doença Inativa e Controle, respectivamente ($p > 0,05$), embora incremento de peroxidação lipídica tenha sido observado para os pacientes com comprometimento renal ($p < 0,05$). A análise do grupo carbonila demonstrou medianas similares entre os grupos testados ($p > 0,05$) enquanto a frequência do momento da cauda não mostrou haver variação importante quanto a esse parâmetro. Para os Grupos Doença Ativa, Doença Inativa e Controle os valores de SOD foram 1707,10 (853,52-2634,80); 1696,20 (909,35-2704,50) e 1870,40 (1506,60-2345,80) U/g Hb ($p > 0,05$) enquanto para GSH-Px os níveis da enzima equivaleram a 19,27 (10,15-44,13); 20,60 (5,90-41,59) e 16,84 (10,97-30,07) U/g Hb ($p > 0,05$), respectivamente. Quando comparados os dados de vitamina C plasmática, similaridade entre os grupos foi observada. As medianas para os Grupos Doença Ativa, Doença Inativa e Controle foram 36,01; 48,67 e 59,32 $\mu\text{mol/L}$ ($p > 0,05$), respectivamente. A correlação entre os níveis da vitamina e o grau de atividade da doença foi significativa. A análise do α -tocoferol plasmático revelou valores de mediana normais ($p > 0,05$). A excreção

urinária de α -tocoferol não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$) exceto quando a comparação considerou o *status* do processo inflamatório pois a excreção urinária da vitamina foi de $0,79 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ para o Subgrupo Processo Inflamatório Agudo contra $0,31 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ do Subgrupo Processo Inflamatório Crônico ($p < 0,05$). **Conclusão:** A peroxidação lipídica não aumentou em consequência da atividade da doença porém mostrou-se maior na presença de acometimento renal. Ainda que excreção aumentada de α -tocoferol tenha sido observada, os dados não permitiram estabelecer a importância do achado em relação à defesa antioxidante.

Palavras-chave: Peroxidação Lipídica; Antioxidantes; Lúpus Eritematoso Sistêmico.

SUMMARY

ROCCO, C. S. **Lipid peroxidation and antioxidants in Systemic Lupus Erythematosus**. 2002. 131 p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP.

Oxidative stress is related to Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and imbalance between free radical and antioxidant generation is probably involved in the worsening of patient health. **Objective:** To study lipid peroxidation and the components of antioxidant defense in SLE. **Cases and methods:** The study was conducted on 54 patients with SLE divided into two groups: Active Disease Group (n=25) and Inactive Disease Group (n=29), and on 12 Controls. The Active Disease Group was subdivided into two subgroups, Acute and Chronic, according to inflammatory process status. Lipid [malondialdehyde (MDA)], protein (carbonyl group) and DNA (Comet Assay) oxidation was determined. The antioxidant defense was quantified on the basis of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), plasma α -tocopherol, and plasma vitamin C. Urinary α -tocopherol excretion was also determined. Data were analyzed statistically by the nonparametric Kruskal-Wallis test and are reported as median and range. **Results:** MDA levels did not differ between groups and were 0.71 (0.30-1.81), 0.61 (0.11-1.82) and 0.53 (0.34-1.04) $\mu\text{mol/L}$ for the Active Disease, Inactive Disease and Control Groups, respectively ($p > 0.05$), although an increase in lipid peroxidation was observed in patients with impaired renal function ($p < 0.05$). Analysis of the carbonyl group demonstrated similar medians for all groups tested ($p > 0.05$), whereas no significant variation was detected in the frequency of tail moment. SOD values were 1707.10 (853.52-2634.80), 1696.20 (909.35-2704.50) and 1870.40 (1506.60-2345.80) U/g Hb for the Active Disease, Inactive Disease and Control Groups, respectively ($p > 0.05$), and GSH-Px levels were 19.27 (10.15-44.13); 20.82 (9.68-41.59) and 16.84 (10.97-30.07) U/g Hb ($p > 0.05$), respectively. Plasma vitamin C levels were similar for all groups, with medians of 36.01, 48.67 and 59.32 $\mu\text{mol/L}$ ($p > 0.05$) for the Active Disease, Inactive Disease and Control Groups, respectively. There was a significant correlation between vitamin C levels and degree of disease activity. Analysis of plasma α -tocopherol revealed normal median values ($p > 0.05$). Urinary α -tocopherol excretion did not differ between groups ($p > 0.05$) except when inflammatory process status was considered, with an excretion rate of 0.79 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ for the Acute Inflammatory Process Subgroup as opposed to 0.31 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ for the Chronic Inflammatory Process Subgroup ($p < 0.05$). **Conclusion:** Lipid peroxidation did not increase as a consequence of disease activity but was higher in the presence of renal involvement. Even though increased α -

tocopherol excretion was observed, the data obtained did not permit us to establish the importance of this finding with respect to antioxidant defense.

Key words: Lipid Peroxidation, Antioxidants, Systemic Lupus Erythematosus.

ANEXOS

ANEXO A

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
SLEDAI (SISTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX)

DATA ANÁLISE: ____/____/____ PACIENTE: _____

PESO	ESCORE	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
8	_____	Convulsão	Início recente. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosas.
8	_____	Psicoses	Habilidade alterada para desenvolvimento de atividades normais devido a sérios distúrbios na percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, perda importante de associações, empobrecimento do pensamento, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Excluir causa decorrente de uremia ou medicamentos
8	_____	Síndrome cerebral orgânica	Função mental alterada com prejuízo do sentido de orientação, memória ou outra função intelectual, de início abrupto com manifestações clínicas flutuantes. Inclui alterações da consciência com diminuição da capacidade de atenção ambiente, mais pelo menos 2 das seguintes características: distúrbio de perceptório, fala incoerente, insônia ou sonolência diurna, ou atividade psicomotora aumentada ou reduzida. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosas.
8	_____	Distúrbio visual	Mudanças relacionadas a retina no LES incluem: corpos cristóides, hemorragias retinianas, exsudatos serosos ou hemorragia na coróide, ou neurite ótica. Excluir hipertensão. Infecção ou causas medicamentosas.
8	_____	Desordem do nervo craniano	Início recente de neuropatia sensorial ou motora envolvendo nervos cranianos.
8	_____	Cefaléia lúpica	Cefaléias grave, persistente, pode ser do tipo migrânea, porém não responsiva à analgésicos narcóticos.
8	_____	AVC	Acidente cerebrovascular. Excluir arteriosclerose.
8	_____	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infarto periungueal, teleangectasias, comprovação de vasculite por biópsia ou angiografia.
4	_____	Artrite	Mais que duas articulações com dor ou sinais inflamatórios (ex: sensibilidade, edema ou derrame)
4	_____	Miosite	Fraqueza/dor na musculatura proximal, associada com elevação da creatinofosfoquinase/aldolase ou alterações de eletromiografia ou biópsia mostrando miosite
4	_____	Cilindros urinários	Cilindros hemo-granulares ou hematócitos
4	_____	Hematúria	> 5 glóbulos vermelhos / campo de grande aumento. Excluir cálculos, infecção ou outras causas;
4	_____	Proteinúria	> 0,5 g/24 horas. Início recente ou aumento recente de mais que 0,5 g/24 horas
4	_____	Piúria	> 5 leucócitos / campo de grande aumento. Excluir infecção
2	_____	Eritema	Início ou recorrência de inflamação tipo eritema
2	_____	Alopecia	Início recente ou recorrência de perda capilar anormal, segmentar ou difusa
2	_____	Úlceras em mucosas	Início recente ou recorrência de úlceras orais ou nasais
2	_____	Pleurite	Dor torácica pleurítica com atrito ou derrame, ou espessamento pleural
2	_____	Pericardite	Dor precordial com ao menos um dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação eletrocardiográfica ou ecocardiográfica
2	_____	Complemento baixo	Decréscimo em CH ₅₀ , C3 ou C4 abaixo do limite inferior de normalidade
2	_____	Aumento da ligação de DNA	> 25 % de ligação pelo ensaio de Farr ou acima da variação normal para testes laboratoriais
1	_____	Febre	> 38 °C. Excluir causas infecciosas
1	_____	Trombocitop.	< 100000 plaquetas/mm ³
1	_____	Leucopenia	< 3000 leucócitos/mm ³ . Excluir causas medicamentosas.

ESCORE _____

ANEXO B

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

NOME: _____ DATA: ____/____/____

FREQUÊNCIA DE CONSUMO

ALIMENTO	FREQUÊNCIA	1/dia	2/dia	1/sema na	2-6 seman a	1/mês	2 ou + mês	Nunca ou quase nunca
	QUANTIDADE							
	Especificação N							
Arroz	Colheres sopa cheia							
Feijão	Concha média							
Macarrão	Escumadeira ou pegador							
Farinha mandioca	Colher sopa							
Pão	_____							
Farelo	_____							
Gérmen de trigo								
Biscoito salgado	Unidades							
Biscoito doce	Unidades							
Bolo	Fatias							
Polenta ou angu	Pedaco							
Batata inglesa	Unidades							
Mandioca	Pedaco							
Milho verde	Espiga							
Pipoca	Sacos							
Inhame, cará	Pedaco							
Lentilha, ervilha, grão de bico	Colher sopa cheia							
Alface	Folhas							
Couve	Colher sopa cheia							
Repolho	Colher sopa cheia							
Cheiro verde	Colher sobremesa							
Chicória	Colher sopa cheia							
Tomate	Unidade							
Chuchu	Colher sopa cheia							
Abóbora	Colher sopa cheia							
Abobrinha	Colher sopa cheia							
Quiabo	Colher sopa cheia							
Pepino	Fatias							
Vagem	Colher sopa cheia							
Cebola								
Alho								
Pimentão								
Cenoura	Colher sopa cheia							
Beterraba	Fatias							
Couve-flor	Ramo ou flor							
Brócolos								
Berinjela								
Ovo	Unidades							
Leite	Copo							
Iogurte								
Queijo								
Requeijão								
Manteiga								
Margarina								
Óleo vegetal								
Laranja								
Mamão								
Banana								
Uva								
Melão								
Melancia								

Continua

ANEXO C

TABELA 6(C) - Valores mínimos e máximos para os parâmetros estudados de acordo com o *status* do processo inflamatório

STATUS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	n	AGUDO (MEDIANA)	n	CRÔNICO (MEDIANA)
DADOS				
IDADE (anos)	8	21,0-47,0	17	14,0-46,0
SLEDAI	8	7,0-18,0	17	8,0-23,0
PROTEINÚRIA (g/24 h)	6	0,02-2,10	14	0,01-7,04
IMC (kg/m ²)	6	20,50-31,01	15	16,20-33,98
EXCREÇÃO α -TOCOF. (μ mol/24 h)	7	0,21-4,09	17	0,07-2,14
α -TOCOF. PLASMA (μ mol/L)	8	18,62-36,18	16	16,47-38,40
COLESTEROL (mg %)	8	87,80-209,06	16	79,98-466,0
VIT C (μ mol/L)	7	20,10-123,52	13	12,06-83,84
GSH-Px (U/g Hb)	8	10,38-37,26	16	10,15-44,13
SOD (U/g Hb)	8	1256,0-2634,8	16	853,52-2332,6
MDA PLASMA (μ mol/L)	8	0,39-0,81	14	0,30-1,81
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)	5	0,52-2,29	10	0,10-4,82

ANEXO D

TABELA 8 (D) - Valores mínimos e máximos para os dados analisados quanto à terapêutica medicamentosa (sem ou com antiinflamatório esteróide) para o Grupo Doença Ativa

DADOS	CONDIÇÃO	n	S/ ANTIIN. (MEDIANA)	n	C/ ANTIIN. (MEDIANA)
IDADE (anos)		14	18,0-47,0	11	14,0-33,0
SLEDAI		14	8,0-22,0	11	7,0-23,0
PROTEINÚRIA (g/24 h)		12	0,02-1,10	8	0,01-7,04
IMC (kg/m ²)		12	20,51-33,98	9	16,20-28,00
EXCREÇÃO α -TOCOF. (μ mol/24 h)		13	0,03-0,79	11	0,13-4,09
α -TOCOF. PLASMA (μ mol/L)		13	18,62-36,26	11	16,47-38,40
COLESTEROL (mg %)		13	79,98-303,06	11	112,10-466,00
VIT C (μ mol/L)		10	12,06-81,77	10	20,10-123,52
GSH-Px (U/g Hb)		13	10,15-37,26	11	12,15-44,13
SOD (U/g Hb)		13	1111,8-2634,8	11	853,52-2230,7
MDA PLASMA (μ mol/L)		11	0,40-1,03	11	0,30-1,18
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)		8	0,21-4,82	7	0,10-1,56

ANEXO E

TABELA 9 (E)- Valores mínimos e máximos para os dados analisados quanto à terapêutica medicamentosa (sem ou com antiinflamatório esteróide) para o Grupo Doença Inativa

DADOS	CONDIÇÃO	n	S/ ANTIIN. (MEDIANA)	n	C/ ANTIIN. (MEDIANA)
IDADE (anos)		24	15,0-58,0	5	37,0-51,0
SLEDAI		24	0-5	5	0-1
PROTEINÚRIA (g/24 h)		8	0,02-0,48	2	0,08-0,14
IMC (kg/m ²)		21	20,11-40,60	5	26,62-39,73
EXCREÇÃO α -TOCOF. (μ mol/24 h)		21	0,04-1,15	5	0,41-4,27
α -TOCOF. PLASMA (μ mol/L)		23	18,14-42,91	5	18,16-40,62
COLESTEROL (mg %)		24	119,60-275,66	4	98,17-174,56
VIT C (μ mol/L)		22	15,08-107,77	5	23,96-108,89
GSH-Px (U/g Hb)		24	5,90-41,59	5	14,54-21,04
SOD (U/g Hb)		24	909,35-2704,5	5	1293,8-2027,6
MDA PLASMA (μ mol/L)		24	0,11-1,82	5	0,29-1,07
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)		17	0,14-2,70	4	0,27-1,38

ANEXO F

TABELA 10 (F) - Valores mínimos e máximos para os dados analisados quanto ao comprometimento renal (renal ou não-renal) para o Grupo Doença Ativa

DADOS	CONDIÇÃO	n	RENAL (MEDIANA)	n	N/ RENAL (MEDIANA)
IDADE (anos)		17	18,0-47,0	8	14,0-32,0
SLEDAI		17	8,0-23,0	8	7,0-15,0
PROTEINÚRIA (g/24 h)		14	0,01-7,04	6	0,02-0,12
IMC (kg/m²)		16	16,20-33,98	5	18,0-28,67
EXCREÇÃO α-TOCOF. (μmol/24 h)		17	0,03-3,07	7	0,19-4,09
α-TOCOF. PLASMA (μmol/L)		17	20,64-38,40	7	16,47-37,99
COLESTEROL (mg %)		17	79,98-466,00	7	87,80-246,95
VIT C (μmol/L)		14	12,06-123,52	6	20,26-68,91
GSH-Px (U/g Hb)		17	10,15-44,13	7	15,95-25,21
SOD (U/g Hb)		17	905,12-2634,12	7	853,52-2076,6
MDA PLASMA (μmol/L)		17	0,30-1,18	6	0,31-0,73
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)		10	0,10-2,29	5	0,21-4,82

ANEXO G

TABELA 11 (G) - Valores mínimos e máximos para os dados analisados quanto ao comprometimento renal (renal ou não-renal) para o Grupo Doença Inativa

DADOS	CONDIÇÃO	n	RENAL (MEDIANA)	n	N/ RENAL (MEDIANA)
IDADE (anos)		19	19,0-56,0	10	15,0-58,0
SLEDAI		19	0-5	10	0-4
PROTEINÚRIA (g/24 h)		11	0,02-0,48	0	-
IMC (kg/m²)		18	20,11-40,60	8	20,87-34,89
EXCREÇÃO α-TOCOF.(μmol/24 h)		18	0,00-4,27	9	0,10-1,60
α-TOCOF. PLASMA (μmol/L)		18	18,14-41,15	10	18,16-42,91
COLESTEROL (mg %)		19	119,60-275,66	9	98,17-237,10
VIT C (μmol/L)		19	23,96-106,46	8	15,08-108,89
GSH-Px (U/g Hb)		19	5,90-41,59	10	9,68-36,89
SOD (U/g Hb)		19	909,35-2704,5	10	1209,4-2459,0
MDA PLASMA (μmol/L)		19	0,11-1,82	10	0,35-1,47
GRUPO CARBONILA (nmol/mg ptna)		14	0,25-2,70	7	0,14-1,38