



ARTIGO ORIGINAL

Papel do estresse oxidativo na manutenção da inflamação em pacientes com artrite reumatóide juvenil

Role of oxidative stress in the maintenance of inflammation in patients with juvenile rheumatoid arthritis

Valderez Araújo Ramos¹, Paulo Alberto Ramos², Maria Carmen Dominguez³

Resumo

Objetivo: Determinar os níveis dos marcadores sanguíneos de estresse oxidativo celular e do sistema enzimático de defesa antioxidante, estabelecendo um perfil oxidativo em pacientes portadores de artrite reumatóide juvenil.

Métodos: Estudo caso-controle que inclui 64 pacientes (46 do sexo feminino) portadores de artrite reumatóide juvenil (ARJ), acompanhados ambulatorialmente pelo Serviço de Reumatologia Pediátrica do Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Espanha. Os pacientes foram separados em três subgrupos, segundo o padrão de início dos sintomas dentro dos primeiros seis meses da doença: poliarticular, oligoarticular e sistêmico. No grupo controle foram incluídos 60 pacientes (38 do sexo feminino) que seguiam controle ambulatorial por doenças de caráter não inflamatório, no mesmo hospital. Foram determinados os níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA), lipoperoxídeos (LPO), hidroperóxidos (HPX), grupos carbonílicos (GC) de proteínas e do glutationo e também a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationo peroxidase (GSH-Px) e da glutationo redutase (GSH-Red).

Resultados: Comparados aos controles, os pacientes portadores de ARJ apresentaram concentrações elevadas dos produtos derivados da lipoperoxidação, avaliada pela determinação dos níveis plasmáticos do MDA, HPX e LPO; dano oxidativo das proteínas circulantes, determinado pelo conteúdo de GC de proteínas plasmáticas; elevação da atividade enzimática da SOD e GSH-Red; e diminuição da atividade da GSH-Px e dos níveis do GSH.

Conclusões: Estes resultados demonstram a presença de dano molecular determinado pelos radicais livres de oxigênio em pacientes com ARJ. A atividade da SOD e as alterações do ciclo enzimático glutationo-redox confirmam uma diminuição da capacidade dos sistemas de defesa intracelular contra a toxicidade induzida pelo estresse oxidativo nestes pacientes.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(2): 125-132: radicais livres, estresse oxidativo, antioxidantes, artrite reumatóide juvenil.

Abstract

Objective: To determine the level of cellular oxidative stress blood markers and the enzymatic system of antioxidant defense establishing the oxidative profile in patients with Juvenile Rheumatoid Arthritis.

Methods: Case-control study that included 64 patients (46 of female sex) with Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA) following clinical control in the Pediatric Rheumatology Service of the Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain. The patients were separated in three subtypes based on the pattern of onset within the first six months of disease: polyarticular, pauciarticular and systemic. The control group included 60 patients (38 of female sex) following clinical control to diseases of non inflammatory nature, in the same hospital. The plasmatic levels of malondialdehyde (MDA), lipoperoxide (LPO), hydroperoxide (HPX), carbonile groups (CG) of proteins and glutathione and the enzymatic activities of Super-oxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase were determined.

Results: The group of patients with JRA presented high concentrations of lipid peroxidation products, evaluated by determining the plasmatic levels of MDA, LPO, and HPX; oxidative damage of the circulate protein, determined by CG contents of plasma proteins; elevation of enzymatic activity of SOD and GSH-Red; decrease of GSH-Px activity and GSH levels.

Conclusions: Our results show the presence of molecular damage determined by oxygen free radicals in the JRA patients. The SOD activity and the changes of glutathione redox enzymatic cycle confirm the decrease of capacity of cellular defense system against the induced toxicity of oxidative stress in these patients.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(2): 125-132: free radicals, oxidative damage, antioxidants, juvenile rheumatoid arthritis.

Introdução

A geração de radicais livres ocorre como parte do processo fisiológico do metabolismo aeróbico, secundária à produção de radicais reativos de oxigênio. Desse modo, o metabolismo celular produz radicais livres em condições fisiológicas, e estes radicais ativos podem ter vários efeitos

1. Doutora em Medicina pela Universidade Autônoma de Barcelona. Neonatologista e Intensivista Neonatal do Instituto Cândida Vargas, João Pessoa, Paraíba, Brasil.
2. Doutor em Medicina pela Universidade de Barcelona. Professor Adjunto do Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal da Paraíba. Campina Grande, Paraíba, Brasil.
3. Doutora em Biologia e Bioquímica. Pesquisadora do Centro de Investigações em Bioquímica e Biologia Molecular. Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Espanha.

úteis, por exemplo, atuando como mecanismo de defesa contra a agressão de microorganismos sob controle de estímulos e sinais moleculares¹. Esses radicais podem também ser gerados por várias células do organismo, induzidas por fontes exógenas (radiações ionizantes, toxinas, drogas, produtos químicos, agentes poluidores ambientais, etc.) e em várias outras situações patológicas. Nestes casos, são produzidos danos aos diferentes componentes celulares².

Em condições normais, os organismos vivos dispõem de sistemas antioxidantes de defesa, constituídos por antioxidantes não enzimáticos, que incluem antioxidantes não protéicos de baixo peso molecular (vitaminas A e E, pró-β-carotenos, ácido úrico, entre outros), e por um sistema enzimático, composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutatíon peroxidase (GSH-Px) e a glutatíon redutase (GSH-Red), capazes de metabolizar os radicais livres de oxigênio. A SOD catalisa a reação de conversão dos ânions superóxidos (O_2^*) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2)³, que é eliminado pela ação das enzimas catalase e glutatíon peroxidase, sendo que esta também inativa outros peróxidos de cadeias longas².

O ataque oxidativo aos componentes essenciais das células por radicais livres de oxigênio é um mecanismo geralmente reconhecido como relevante na patogenia de várias enfermidades, tais como as doenças cardiovasculares, a aterosclerose, o *diabetes mellitus* e as doenças inflamatórias reumáticas^{4,5}. O aumento de nível em vários indicadores biológicos relacionados com o dano oxidativo celular, tais como rotura das membranas por lipoperoxidação, rotura das cadeias de DNA e alterações na estrutura ou função das proteínas⁶, tem sido demonstrado nessas situações. Essas modificações podem estar diretamente relacionadas com os marcadores dos processos inflamatórios utilizados de rotina.

Na artrite reumatóide juvenil (ARJ), os radicais livres de oxigênio podem estar implicados, por exemplo, na patogênese da sinovite inflamatória. As células presentes na articulação inflamada (macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais), uma vez isoladas e estimuladas, são capazes de produzir radicais livres de oxigênio. Estes radicais, na presença de moléculas de lipídios, DNA, proteínas, carboidratos ou proteoglicanos, provocam lesão oxidativa⁷. Da mesma forma, está bem conhecida a relação entre os radicais livres de oxigênio e o dano de cartilagem articular. Os radicais hidroxil podem degradar a cartilagem⁶. O ácido hipocloroso pode atacar proteoglicanos, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) inibe a sua síntese⁸. A aplicação intra-articular de H_2O_2 , em ratas, induz à produção da enzima glicose oxidase, que causa grave lesão articular e morte de condrócitos⁹. A combinação do aumento da degradação com inibição da síntese favorece a destruição da cartilagem.

Os radicais livres de oxigênio são agentes indutores da lipoperoxidação, que determinam a depleção de ácidos graxos insaturados da membrana celular, induzindo a perda

da sua integridade e a alteração funcional de seus receptores e enzimas¹⁰. A alteração na composição dos ácidos graxos de membrana celular foi documentada em várias doenças reumáticas como na Síndrome de Sjögren¹¹, na ARJ¹² e na artrite reumatóide¹³. Os radicais peróxidos e hidroxil induzem à peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de membranas celulares que, por exemplo, nos eritrócitos, determinam um aumento na rigidez e na deformabilidade destas células, com conseqüente aumento da susceptibilidade à hemólise.

O objetivo deste estudo foi determinar o perfil dos marcadores sanguíneos do dano oxidativo celular e do sistema enzimático de defesa antioxidante em pacientes portadores de artrite reumatóide juvenil.

Casuística e Métodos

Pacientes

Foram estudados transversalmente 64 pacientes, 46 do sexo feminino e 18 do sexo masculino, com idades compreendidas entre 1,6 e 28 anos (idade média de 12,1±5,4 anos) portadores de ARJ. Os pacientes adultos (n=5) apresentavam em comum uma longa evolução da doença (variando de 120 a 312 meses) e seguiam controles clínicos rigorosos desde a infância no Serviço de Reumatologia Pediátrica do Hospital Vall d'Hebron. Os pacientes foram separados em três subgrupos de acordo com o padrão de início dos sintomas dentro dos primeiros seis meses da doença: poliarticular, oligoarticular e sistêmico, segundo os critérios da *American Rheumatism Association*.

Os pacientes de cada subgrupo clínico foram classificados de acordo com o grau de atividade da doença, que tem por base a presença de sintomas e a velocidade de sedimentação globular (VSG) no momento da coleta de sangue (Tabela 1).

O subgrupo poliarticular foi constituído por 17 pacientes, 14 do sexo feminino, com idades compreendidas entre 2,6 e 28 anos (idade média de 5,6±0,9 anos). O período de evolução da doença variou entre 13 e 312 meses.

O subgrupo oligoarticular foi constituído por 35 pacientes, 25 do sexo feminino, com idades compreendidas entre 1,6 e 24,5 anos (idade média de 11,2±5,1 anos). O período de evolução da doença variou entre 11 e 151 meses.

O subgrupo sistêmico foi constituído por 12 pacientes, 7 do sexo feminino, com idades compreendidas entre 3,3 e 18 anos (idade média de 11,0±4,6 anos). O período de evolução da doença variou entre 2 e 150 meses.

Os dados clínicos, os índices de atividade da doença e o tratamento utilizado no momento da coleta do sangue foram determinados para os subgrupos poliarticular, oligoarticular e sistêmico.

O grupo controle consistiu de 60 pacientes, 38 do sexo feminino, com idades compreendidas entre 1,5 e 26 anos. Estes pacientes seguiam controle ambulatorial por doenças de caráter não inflamatório, a maioria deles em avaliação pré-operatória para pequenos procedimentos cirúrgicos.

Tabela 1 - Critérios de classificação dos pacientes segundo o grau de atividade da ARJ

Grau de Atividade	Classificação	Sintomatologia	VSG
Ativa com tratamento	A ₁	Presente	< 20
	A ₂	Presente	entre 20 e 40
	A ₃	Presente	> 40
Inativa com tratamento	B	Ausente	Normal
Inativa sem tratamento	C	Ausente	Normal

VSG: velocidade de sedimentação globular

Amostras de sangue

Amostras de sangue venoso foram obtidas dos pacientes e controles em jejum, sendo 2 ml de sangue com EDTA, 2 ml com heparina e 2 ml sem anticoagulante. Alíquotas de soro foram obtidas após a centrifugação do sangue sem anticoagulante a 1.500g e 4°C durante 10 minutos. As amostras de sangue com EDTA e heparina foram centrifugadas nas mesmas condições, sendo obtidas alíquotas de hemácias e de plasma. Todas as alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

Marcadores de peroxidação lipídica e protéica

Foram determinados os níveis de malondialdeído (MDA), lipoperóxidos (LPO), hidroperóxidos (HPX) e dos grupos carbonilos (GC) de proteínas plasmáticas. Os níveis plasmáticos de MDA e de LPO foram determinados espectrofluorimetricamente após a reação com o ácido dietilthiobarbitúrico (TBA)^{14,15}. Os HPX plasmáticos foram quantificados por meio de ensaio espectrofotométrico de PIERCE (*PeroXOquant™ Quantitative Peroxide Assay*) de acordo com o método de Nourooz-Zadeh et al.¹⁶. Os GC de proteínas plasmáticas foram medidos, utilizando o método de Levine et al.¹⁷.

Marcadores de atividade do sistema antioxidante enzimático

Foram determinadas as atividades das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Glutatio Peroxidase (GSH-Px) e Glutatio Redutase (GSH-Red) e os níveis de Glutatio (GSH) em sangue total. A atividade enzimática da SOD em hemácias foi determinada espectrofotometricamente, segundo o ensaio descrito por Nebot et al.¹⁸. A atividade de GSH-Px em hemácias foi quantificada por meio de ensaio colorimétrico, utilizando um método que tem por base a técnica desenvolvida por Paglia e Valentine¹⁹. A atividade da GSH-Red em plasma foi determinada espectrofotometricamente, utilizando o método descrito por Goldberg e Spooner²⁰. O GSH foi quantificado por meio de ensaio colorimétrico, utilizando o kit reativo Bioxitec® GSH-400 da *Oxis International Inc.* (Portland - USA).

Análises estatísticas dos resultados

Os resultados foram apresentados como valores médios \pm erro padrão do grupo total de pacientes, subgrupos clínicos e grupo controle, sendo estatisticamente comparados por regressão linear simples e análise de variância (ANOVA), utilizando o programa estatístico *Stat View II™* da *Abacus Concepts* (Berkeley - USA). O nível de confiança assumido foi de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados dos marcadores de peroxidação lipídica e protéica e da atividade do sistema antioxidante enzimático, observados no grupo total de pacientes portadores de ARJ, nos subgrupos clínicos e no grupo controle.

Os níveis plasmáticos do MDA se mostraram significativamente aumentados em relação aos controles, tanto no grupo total de pacientes portadores de ARJ quanto nos diferentes subgrupos clínicos (Tabela 2). Nos subgrupos separados por formas clínicas de apresentação da doença, os valores do MDA estavam significativamente mais elevados que os observados no grupo controle e progressivamente superiores nas formas poliarticular, oligoarticular e sistêmica (Figura 1).

Os LPO plasmáticos estavam aumentados no grupo de pacientes com ARJ, mas as diferenças não foram significativas quando comparado este grupo com os pacientes controles. O subgrupo de pacientes com a forma sistêmica da doença mostraram valores significativamente aumentados quando comparados ao subgrupo com doença oligoarticular ($p < 0,02$) e aos pacientes controles ($p < 0,01$) (Tabela 2).

Os níveis plasmáticos médios dos HPX nos pacientes com ARJ se mostraram aumentados em relação aos dos controles. O subgrupo poliarticular exibiu valores de HPX semelhantes aos do grupo controle. Não se observaram diferenças significativas entre o grupo total de pacientes com ARJ e os subgrupos poliarticular e oligoarticular em relação aos controles (Tabela 2). O subgrupo de pacientes com a forma sistêmica da ARJ apresentou os níveis médios

Tabela 2 - Marcadores da peroxidação lipídica e protéica do número total de pacientes, subgrupos clínicos e controles

	ARJ (n=64)	Poliarticular (n=17)	Oligoarticular (n=35)	Sistêmico (n=12)	Controle (n=60)
MDA (M/L)	0,72±0,05 p<0,0001	0,62±0,04 p<0,0001	0,74±0,07 p<0,0001	0,77±0,13 p<0,0001	0,33±0,008
LPO (µM/L)	1,92±0,08 NS	2,05±0,17 NS	1,77±0,1 NS	2,21±0,15 p<0,01	1,76±0,05
HPX (µM/L)	6,04±0,83 NS	4,75±1,04 NS	5,40±1,03 NS	9,75±2,78 p<0,01	4,76±0,53
GC (nmol/g)	0,68±0,05 p<0,0001	0,60±0,08 p<0,01	0,67±0,06 p<0,0001	0,83±0,15 p<0,0001	0,36±0,03

ARJ: artrite reumatóide juvenil; MDA: malondialdeído; LPO: lipoperóxidos; HPX: hidroperóxidos; GC: grupos carbonilos de proteínas; NS: não significativo, nível de significância (p) em relação ao grupo controle

mais elevados e as diferenças foram significativas quando comparados aos controles e aos subgrupos poliarticular e oligoarticular ($p<0,02$).

Os níveis dos GC de proteínas plasmáticas se mostraram elevados em relação aos controles quando comparados o grupo total de pacientes com ARJ e os subgrupos clínicos (Figura 2). As diferenças observadas foram estatisticamente significativas entre o grupo total de pacientes ($p<0,0001$), subgrupo oligoarticular ($p<0,0001$), subgrupo sistêmico ($p<0,0001$) e o subgrupo poliarticular ($p<0,01$) quando

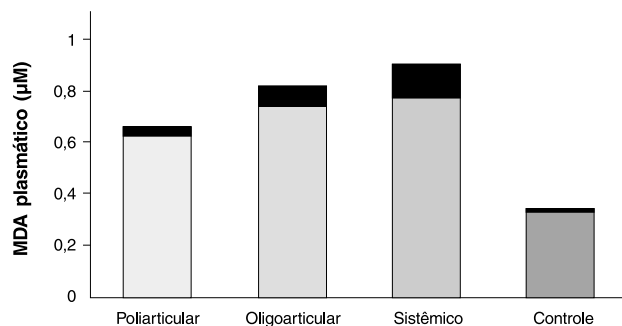


Figura 1 - Concentrações plasmáticas de malondialdeído (MDA) em pacientes separados por formas clínicas de artrite reumatóide juvenil e no grupo controle. Os histogramas representam os valores médios e as áreas achureadas acima de cada um deles, o erro padrão. Os níveis de significância observados entre os subgrupos Poliarticular, Oligoarticular e Sistêmico, comparados com os controles, foram $p < 0,0001$

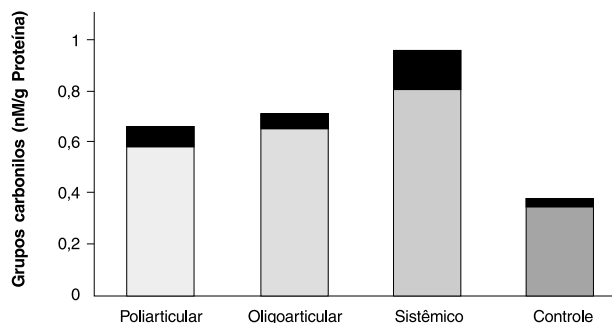


Figura 2 - Concentrações plasmáticas dos grupos carbonilos de proteínas plasmáticas em pacientes separados por formas clínicas de ARJ e no grupo controle. Os histogramas representam os valores médios e as áreas achureadas acima de cada um deles, o erro padrão. Os níveis de significância foram $p<0,01$ entre o subgrupo Poliarticular e os Controles e $p<0,0001$ entre os subgrupos Oligoarticular e Sistêmico, comparados com o grupo Controle

comparados com o grupo controle (Tabela 2). Os níveis mais elevados do conteúdo carbonilo de proteínas plasmáticas em ARJ foram observados nos pacientes portadores da forma sistêmica da doença. As diferenças observadas nos subgrupos de pacientes separados por formas clínicas não foram significativas.

A atividade enzimática da SOD eritrocitária estava aumentada, quando comparada aos controles, tanto no grupo total de pacientes com ARJ quanto nos diferentes subgrupos clínicos da doença. As diferenças observadas entre o grupo total de pacientes ($p<0,0001$), os subgrupos

de doença poliarticular ($p < 0,05$), oligoarticular ($p < 0,0001$) e sistêmico ($p < 0,001$) foram estatisticamente significativas quando comparadas ao grupo controle (Tabela 3). Quando comparados entre si, os subgrupos separados por formas clínicas não exibiram diferenças estatisticamente significativas.

Os valores médios do GSH no sangue se mostraram significativamente diminuídos em relação aos controles, no grupo total de pacientes portadores de ARJ e nos subgrupos de pacientes com as formas clínicas poliarticular e sistêmica (Tabela 3). A concentração média do GSH no subgrupo oligoarticular foi ligeiramente mais baixa, mas sem significação estatística quando comparada ao grupo controle. A concentração média do GSH no subgrupo com ARJ sistêmica apresentou os valores mais baixos em relação aos controles e demais subgrupos. Quando comparados os subgrupos poliarticular, oligoarticular e sistêmico, foram observadas diferenças significativas entre os subgrupos poliarticular e sistêmico ($p < 0,02$).

A atividade enzimática da GSH-Px eritrocitária estava diminuída em relação aos controles, tanto no grupo total de pacientes com ARJ quanto nos subgrupos separados por formas clínicas da doença (Figura 3), com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,0001$). As diferenças observadas entre os subgrupos clínicos não foram significativas (Tabela 3).

A atividade enzimática da GSH-Red plasmática estava aumentada em relação à dos controles, tanto no grupo total de pacientes com ARJ quanto nos subgrupos separados

segundo as formas clínicas, observando-se os valores mais elevados no grupo de pacientes com doença sistêmica. As diferenças foram estatisticamente significativas tanto entre o grupo total de pacientes com ARJ ($p < 0,0001$), como entre os subgrupos de doença poliarticular ($p < 0,01$), oligoarticular ($p < 0,01$) e sistêmica ($p < 0,0001$), quando comparados aos controles (Tabela 3).

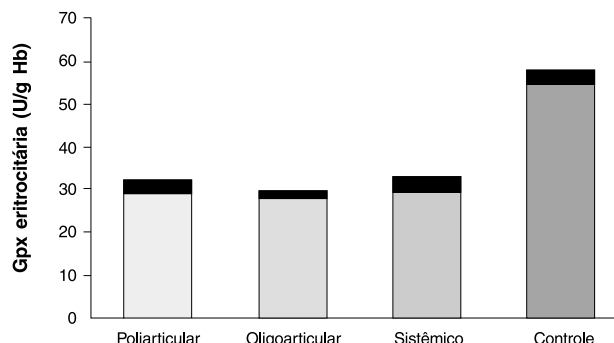


Figura 3 - Atividade enzimática da glutatião peroxidase eritrocitária em pacientes com ARJ separados por formas clínicas e no grupo controle. Os histogramas representam os valores médios e as áreas achureadas acima de cada um deles o erro padrão. Os níveis de significância observados entre os subgrupos Poliarticular, Oligoarticular e Sistêmico, comparados com os Controles, foi $p < 0,0001$

Tabela 3 - Marcadores de atividade do sistema enzimático antioxidante do grupo total de pacientes, subgrupos clínicos e controles

	ARJ (n=64)	Poliarticular (n=17)	Oligoarticular (n=35)	Sistêmico (n=12)	Controle (n=60)
SOD (U/ml)	9,22±0,2 $p < 0,0001$	8,8±0,33 $p < 0,05$	9,34±0,3 $p < 0,0001$	9,47±0,4 $p < 0,001$	7,84±0,21
GSH (mM)	1207,94±75,3 $p < 0,05$	1106,5±153,6 $p < 0,05$	1353,7±104,8 NS	926,5±106,23 $p < 0,01$	1394,0±47,04
GSH-Px (U/g Hb)	28,46±1,51 $p < 0,0001$	28,92±3,12 $p < 0,0001$	27,96±1,96 $p < 0,0001$	29,30±3,8 $p < 0,0001$	54,49±3,25
GSH-Red (U/L)	94,41±3,85 $p < 0,0001$	91,59±7,22 $p < 0,01$	87,82±3,6 $p < 0,01$	117,64±12,97 $p < 0,0001$	75,63±1,3

ARJ: artrite reumatóide juvenil; SOD: superóxido dismutase; GSH: glutatião; GSH-Px: glutatião peroxidase; GSH-Red: glutatião redutase; NS: não significativo, nível de significância (p) em relação ao grupo controle

Discussão

Os resultados apresentados neste estudo resultam do interesse na determinação, em líquidos orgânicos ou células, dos produtos da peroxidação de lipídios e proteínas.

O malondialdeído (MDA) é um produto gerado na oxigenação enzimática do ácido araquidônico e um produto da degradação oxidativa dos lipídios^{21,22}. Em nossos pacientes, a concentração plasmática do MDA foi significativamente mais elevada quando comparada aos controles. Estes resultados são similares aos publicados por Bernacka *et al.*²³, que encontraram concentrações séricas de MDA elevadas em pacientes com Artrite Reumatóide, sugerindo que em pacientes com inflamação articular, a lipoperoxidação está aumentada. Resultados semelhantes foram descritos no líquido sinovial. A detecção dos produtos da peroxidação lipídica no líquido sinovial e no soro de pacientes com Artrite Reumatóide tem sido reconhecida como uma evidência indireta da importância dos radicais livres na patogênese desta doença²⁴.

Com os pacientes divididos segundo as formas clínicas clássicas da ARJ, se pode confirmar diferenças bastante significativas entre os três subgrupos clínicos com relação aos controles. Podemos observar que o subgrupo de pacientes com a forma sistêmica, considerada a mais grave da doença, apresentou o nível mais elevado de MDA. Neste subgrupo, registramos o maior número de reagudizações e pacientes com curta duração de tratamento adequado, o que poderia justificar o alto grau de estresse oxidativo. Estas observações concordam com os resultados obtidos por Meres *et al.*²⁵ e Imadaya *et al.*²⁶, que descreveram um aumento das concentrações do MDA em pacientes adultos portadores de artrite reumatóide.

Em nosso grupo de pacientes, as concentrações plasmáticas de LPO, que também são produtos finais do processo de lipoperoxidação, se mostraram elevadas quando comparadas com o grupo controle, mas sem diferenças estatisticamente significativas. No entanto, separados por formas clínicas da doença, foi possível demonstrar uma diferença significativa entre os pacientes portadores da forma sistêmica com relação aos subgrupos oligoarticular e controle. Essas concentrações mais elevadas de LPO são coerentes com os níveis do MDA, igualmente elevadas no subgrupo de pacientes com a doença sistêmica.

A reação do oxigênio com os lipídios insaturados produz grande número de compostos, entre os quais os hidroperóxidos (HPX), que são seus produtos iniciais²⁷. Segundo Nourooz-Zadeh *et al.*¹⁶, concentrações elevadas de HPX no plasma são uma evidência direta da existência de estresse oxidativo.

No grupo total de pacientes com ARJ, os níveis de HPX plasmáticos se mostraram aumentados quando comparados aos controles, mas sem diferenças estatisticamente significativas. O subgrupo de portadores da forma sistêmica de ARJ apresentou um aumento significativo nas concentrações de HPX, quando comparado com os demais subgru-

pos, separados por forma clínica da doença, e com os controles. Esse fato pode ser justificado pela agressividade peculiar dessa forma clínica, onde os marcadores da lipoperoxidação apresentaram elevações mais importantes.

A oxidação de proteínas está caracterizada tipicamente pela introdução de grupos carbonilos nas cadeias laterais das proteínas. A quantificação dos grupos carbonilos ligados às proteínas proporciona um método que permite avaliar a extensão da modificação oxidativa^{17,28}. Vários estudos descreveram aumentos nos níveis dos grupos carbonilos após fenômenos de isquemia-reperfusão, após correção de hipernatremia, em cataratas, no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, no processo de envelhecimento e em células expostas a neutrófilos ativadas²⁹⁻³³.

A prolongada exposição de proteínas aos radicais livres leva a modificações espontâneas³². Essas reações complexas resultam no acúmulo e degradação das proteínas danificadas. As alterações oxidativas de proteínas foram descritas como um dos mecanismos de marcação proteica nos fenômenos de destruição e reposição de proteínas. Os estudos de Starke-Reed e Oliver³⁴ sugerem que o estresse oxidativo pode induzir as proteases à digestão proteica. É possível que o aumento da oxidação de proteínas no líquido sinovial de pacientes com artrite se justifique pela elevada proteólise que ocorre no interior da articulação nestes doentes³⁵.

Com relação aos grupos carbonilos de proteínas, que indicam o efeito direto da oxidação proteica, nossos resultados mostraram níveis significativamente aumentados no plasma dos pacientes portadores de ARJ, tanto no grupo total quanto nos subgrupos separados por formas clínicas, quando comparados com os controles. As concentrações plasmáticas mais elevadas foram observadas no subgrupo de pacientes com a forma sistêmica da ARJ.

As concentrações elevadas do conteúdo de grupos carbonilos de proteínas podem provocar uma desestabilização ou inativação da atividade biológica³¹. Outros estudos postularam que a concentração dessas proteínas oxidadas aumenta com a idade³⁶, com a exposição (em animais de laboratório) ao oxigênio a 100%³⁷ e com a diminuição da atividade biológica das enzimas e conseqüente aumento da labilidade celular³⁴.

O radical superóxido é o primeiro produto da redução do oxigênio molecular. Além de sua toxicidade intrínseca, é uma importante fonte de hidroperóxidos e outros radicais livres reativos³⁸. A atividade da superóxido dismutase (SOD), que cataliza a dismutação dos radicais superóxido a H₂O₂ e oxigênio molecular, protege células e tecidos da ação dos radicais superóxidos³⁹ e de outros peróxidos, tais como os lipoperoxídios *in vivo*. Estas enzimas representam a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido e são rapidamente induzidas em algumas condições como a exposição ao estresse oxidativo.

Alguns autores têm observado que o estresse oxidativo induz a atividade da SOD em leucócitos e eritrócitos⁴⁰.

Teoricamente, como nos eritrócitos não existe síntese protéica, não teria que haver indução da atividade enzimática. Porém, nas células precursoras dos eritrócitos é possível ocorrer indução da SOD secundária ao processo oxidativo. Esse fato explicaria o aumento de atividade da SOD eritrocitária observada em nosso estudo, tanto no grupo total de pacientes quanto nos subgrupos separados por formas clínicas, quando comparados aos controles. Como a SOD representa a primeira barreira intracelular do sistema de defesa antioxidante, e sua atividade pode aumentar para compensar a excessiva produção de radicais superóxido, o aumento observado na atividade da enzima sugere uma resposta adaptativa do organismo no combate aos possíveis danos determinados pelos radicais livres de oxigênio.

O ciclo enzimático Glutatião Redox representa a defesa intracelular mais importante contra a toxicidade induzida pelos radicais livres de oxigênio. O ciclo compreende o Glutatião (GSH) e as enzimas Glutatião peroxidase (GSH-Px) e Glutatião redutase (GSH-Red). A enzima GSH-Px utiliza o GSH como substrato em reações que catalizam a redução do H_2O_2 , de ácidos graxos e hidroperóxidos orgânicos até água e ácidos graxos hidroxilados⁴¹. Enquanto ocorre a redução dos peróxidos, é produzido o GSH oxidado, que é reduzido pela enzima GSH-Red, regenerando o GSH. Sob condições de estresse oxidativo, a capacidade do ciclo Glutatião Redox se excede, aumentando a concentração de GSH oxidado que é eliminado pela bile, diminuindo conseqüentemente os níveis de GSH⁴².

Comparados aos controles, a diminuição significativa da atividade da GSH-Px eritrocitária, no grupo total de pacientes com ARJ e nos subgrupos separados por formas clínicas, poderia ser explicada diretamente pela diminuição do conteúdo de GSH encontrado em pacientes artríticos, uma vez que o GSH é o substrato e cofator da GSH-Px. Além disso, os níveis mais baixos de GSH implicam em baixa atividade da GSH-Px e este fato pode condicionar um aumento na vulnerabilidade ao estresse oxidativo.

Além da diminuição da quantidade do GSH disponível, a diminuição da atividade da GSH-Px pode também ser explicada pelo processo de inativação enzimática. A própria enzima pode ser inativada em condições de intenso estresse oxidativo, o que contribui para a baixa atividade da GSH-Px⁴³.

A Glutatião redutase desempenha um papel antioxidante intracelular importante na manutenção de uma relação GSH/Glutatião oxidado elevada, condição essencial para a proteção contra o dano oxidativo. A atividade enzimática da GSH-Red plasmática se mostrou significativamente aumentada, em relação aos controles, no grupo total de pacientes com ARJ e nos subgrupos separados segundo as formas clínicas. Esse resultado sugere uma resposta adaptativa frente a uma elevação do estresse oxidativo e poderia ser conseqüência de um processo de indução enzimática.

Em conclusão, o estudo demonstra a presença de concentrações elevadas de produtos derivados do processo de

lipoperoxidação, avaliada pela determinação dos níveis plasmáticos do MDA, HPX e LPO, e do dano oxidativo das proteínas circulantes, determinado pelo conteúdo de GC de proteínas plasmáticas. Esses resultados sugerem a implicação do dano celular determinado pelos radicais livres de oxigênio na patogênese da artrite reumatóide juvenil. A elevação da atividade da enzima antioxidante SOD e as alterações observadas no ciclo enzimático Glutatião-Redox, que compreende o GSH e as enzimas GSH-Px e GSH-Red, avaliadas em seu conjunto, confirmam uma diminuição da capacidade dos sistemas de defesa intracelular contra a toxicidade induzida pelo estresse oxidativo nesses pacientes. Os pacientes portadores da forma sistêmica da ARJ apresentaram as alterações mais notáveis relacionadas com a presença de estresse oxidativo sistêmico, caracterizado por uma intensa peroxidação lipídica e protéica e uma menor capacidade dos sistemas de defesa antioxidante.

Referências bibliográficas

1. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, ed. Oxidative stress. London: Academic Press; 1985. p.1-8.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in Biology and Medicine. 2ª ed. London: Clarendon Press Oxford; 1989.
3. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.
4. Humad S, Zarling EJ, Skosey J. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: measurement of pentane in breath samples by gas chromatography (Abstract). *Clin Res* 1985;33:919A.
5. Plachta H, Bartnikowska E, Obara A. Lipid peroxides in blood from patients with atherosclerosis of coronary and peripheral arteries. *Clin Chim Acta* 1992;211:101-02.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Mol Aspects Med* 1985;8:89-193.
7. Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr* 1985;5:365-90.
8. Bates EJ, Johnson CC, Lother DA. Inhibition of proteoglycan synthesis by hydrogen peroxide in cultured bovine articular cartilage. *Biochem Biophys Acta* 1985;838:221-28.
9. Dabbagh A, Morris CJ, Blake DR. Hydrogen peroxide-initiated animal model of acute inflammation. *Br J Rheumatol* 1989; 28:45-47.
10. Bowles DK, Torgan CE, Ebner S. Effect of acute, submaximal exercise on skeletal muscle vitamin E. *Free Rad Res Comms* 1991;14:139-43.
11. Horrobin DF. Essential fatty acid metabolism in diseases of connective tissue with special reference to scleroderma and to Sjögren's syndrome. *Med Hypotheses* 1984;14:233-47.
12. Johansson U, Portinsson S, Akesson A, Dvantsesson H, Akesson B. Fatty acid composition of plasma phosphatidylcholine and erythrocyte lipids and dietary fat intake in juvenile chronic arthritis. *Prog Lipid Res* 1986;25:579-82.
13. Jacobsson L, Lindgarde F, Manthorpe R, Akesson B. Correlation of fatty acid composition of adipose tissue lipids and serum phosphatidylcholine and serum concentrations of micronutrients with disease duration in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990;49:901-05.

14. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In: Packer L, ed. *Methods in Enzymology*. London: Academic Press; 1984. Vol. 105. p.328-31.
15. Richard MJ, Portal B, Meo J. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* 1992;38:704-09.
16. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmandi J, McCarthy S, Betteridge J, Wolff SP. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 1995;44:1054-58.
17. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;233:346-57.
18. Nebot C, Moutet M, Huet P. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autooxidation of a tetracyclic catechol. *Anal Biochem* 1993;214:442-51.
19. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
20. Goldberg DM, Spooner RJ. In: Bergmeyer HV, ed. *Methods of Enzymatic Analysis* Deerfield Beach: Verlog Chemie; 1983. Vol 3. p.258-65.
21. Bird RP, Draper HH. Comparative studies of different methods of malondialdehyde determination. *Methods Enzymol* 1984; 105:299-305.
22. Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the *in vivo* aging of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1988; 937:205-10.
23. Bernacka K, Sierakowsky S, Klimiuk PA, Chwiecko J. Concentration of Malondialdehyde in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Folia Histochem Cytobiol* 1992;30:203-04.
24. Rowley D, Gutteridge JMC, Blake D. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. Thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin Sci* 1984;66:691-95.
25. Mezes M, Par A, Bartosiewicz G, Nemeth J. Vitamin E content and lipid peroxidation of blood in some chronic inflammatory diseases. *Acta Physiol Hungarica* 1987;69:133-38.
26. Imadaya A, Teresawa K, Tosa H, Okamoto M, Toriizuka K. Erythrocyte antioxidant enzymes are reduced in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1988;15:1628-31.
27. Frankel EN. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog Lipid Res* 1983;23:197-221.
28. Levine RL, Garland D, Oliver CN. The determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: Packer L, Glazer NA, eds. *Methods in Enzymology*. London: Academic Press; 1990; Vol 186. p.464-77.
29. Mickel HS, Starke-Reed PE, Oliver CN. Protein oxidation and myelinolysis occur in brain following rapid correction of hyponatremia. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:92-97.
30. Garland D. Role of site-specific, metal-catalyzed oxidation in lens-aging and cataract: a hypothesis. *Exp Eye Res* 1990;50:677-82.
31. Chapman ML, Rubin BR, Gracy RW. Increased carbonyl content of proteins in sinovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989;16:15-8.
32. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257:1220-24.
33. Musci G, di Patti MCB, Fagiolo U, Calabrese L. Age-related changes in human ceruloplasmin. Evidence for oxidative modifications. *J Biol Chem* 1993;268:13388-95.
34. Starke-Reed PE, Oliver CN. Oxidative modification of enzymes during aging and acute oxidative stress. In: Simic MG, Ward JF, Taylor KA, eds. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. New York: Plenum; 1988.
35. Al-Haik N, Lewis DA, Struthers G. Neutral protease, collagenase and elastase activities in synovial fluids from arthritic patients. *Agents Actions* 1984;15:436-42.
36. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 1987;262:5488-91.
37. Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER. Modification of hepatic proteins in rats exposed to high oxygen concentration. *FASEB J* 1987;1:36-9.
38. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64:97-112.
39. Okabe T, Hamaguchi K, Inafuku T, Hara M. Aging and superoxide dismutase activity in cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci* 1996; 141:100-104.
40. Asamaya K, Shiki Y, Ito H, Miyao A. Antioxidant enzymes and lipoperoxide in blood in uremic children and adolescents. *Free Rad Biol Med* 1990;9:105-09.
41. Kretzchmar M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp Toxic Pathol* 1996;48:439-46.
42. Ekclöw L, Moldeus P, Orrenius S. Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism. A study using isolated hepatocytes and glutathione reductase inhibitor 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Eur J Biochem* 1984;138:459-63.
43. Condell RA, Trappel AL. Evidence for suitability of glutathione peroxidase as a protective enzyme. Studies of oxidative damage, restoration and proteolysis. *Arch Biochem Biophys* 1983; 223:407-16.

Endereço para correspondência:

Dra. Valderez Araújo Ramos
 Rua Fernando Luiz H. dos Santos, 226/Apto 401
 Bessa - CEP 58037-050 - João Pessoa - Paraíba
 Fone: (83) 246.2585
 E-mail: varaujo@brasilink.com.br