

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES FUMANTES CRÔNICOS

Roberta Cattaneo Horn^{1, 2}
Cristieli Carine Braun¹
Natacha Cossetin Mor²
Caroline Oliveira¹
Gabriela Tassotti Gelatti¹
Cecília Gabriela Rubert Possenti¹
Thiago Gomes Heck¹

RESUMO

O consumo do cigarro associado ao estresse oxidativo aumenta muito as chances do desenvolvimento de várias patologias. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil oxidativo e antioxidante de indivíduos fumantes crônicos. Tal avaliação foi realizada por meio da análise dos níveis de lipoperoxidação pela determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Tbars), análise dos níveis de lesões em proteínas pela determinação das proteínas carboniladas e avaliação dos níveis de alguns antioxidantes não enzimáticos como: o ácido úrico e a glutatona reduzida (GSH). Os resultados obtidos mostraram uma elevação significativa nos níveis de Tbars, proteínas carboniladas e GSH no grupo dos fumantes crônicos quando comparados ao grupo controle. Em contrapartida, os níveis de ácido úrico não mostraram diferenças consideráveis entre os grupos estudados. Estes resultados indicam a presença significativa de danos em lipídeos e proteínas celulares e, portanto, uma maior suscetibilidade do indivíduo fumante desenvolver patologias como câncer e doenças respiratórias.

Palavras-chave: Tabagismo. Dano oxidativo. Antioxidantes.

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS LEVELS IN PATIENTS SMOKING CHRONIC

ABSTRACT

The cigarette consumption associated with oxidative stress increases greatly the chances of developing many diseases. Thus, the objective of this study was to evaluate the oxidative profile and antioxidant chronic smokers. This evaluation was performed by analysis of lipid peroxidation levels by determining thiobarbituric acid (TBARS), analysis of proteins in injury levels for the determination of protein carbonyls and assessment of the levels of some non-enzymatic antioxidants such as acid uric acid and reduced glutathione (GSH). The results showed a significant elevation in the levels of TBARS, protein carbonyls and GSH in the group of chronic smokers, when compared to the control group. However, uric acid levels showed no significant differences between groups. These results indicate the presence of significant damage to lipids and cellular proteins, and thus a greater susceptibility of the individual smoker developing pathologies such as cancer and respiratory diseases.

Keywords: Smoking. Oxidative damage. Antioxidants.

¹ Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde [Universidade de Cruz Alta (Unicruz). Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Unijuí)]. rcattaneo@unicruz.edu.br

² Professoras do Curso de Farmácia da Unicruz. Cruz Alta, RS.

O tabagismo é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de inúmeras patologias, dentre elas carcinomas, doenças cardíacas, vasculares e pulmonares. Entre as patologias merece destaque o câncer de pulmão, cujos óbitos são relacionados a 1/6 de todas as mortes por cânceres (Duarte; Paschoal, 2005). O índice de fumantes, porém, aumenta consideravelmente em todo o mundo, e a previsão é de que 10 milhões de mortes ligadas ao cigarro ocorram em 70% dos países em desenvolvimento até 2020 (Giusti, 2007; Martini et al., 2011). No Brasil, visando a conter esta previsão impactante, recentemente foi aprovada uma lei que impede o uso do cigarro em locais fechados (Bialous et al., 2010).

Embora os mecanismos subjacentes envolvidos nas patologias associadas ao tabagismo ativo ou passivo sejam ainda um assunto a ser debatido, supõe-se que os danos oxidativos induzidos pelas Espécies Reativas (ERs) exerçam um papel fundamental na patogênese das doenças relacionadas ao tabagismo (Yildirim et al., 2011). Alguns experimentos comprovam a importância do tabaco na lesão pulmonar ocasionada pelo estresse oxidativo. A fumaça do cigarro induz níveis altos de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) nas vias aéreas humanas, podendo levar à inflamação e maior liberação de proteases (Júnior et al., 2005).

Tendo em vista que o ataque de algumas EROs podem causar a peroxidação lipídica nos ácidos graxos de membrana ou alterações proteicas, induzindo modificações estruturais nas moléculas biológicas, as concentrações plasmáticas de substâncias reativas ao ácido barbitúrico (Tbars) são utilizadas como um índice de rastreamento e monitorização da lipoperoxidação e a determinação de proteínas carboniladas é utilizada como marcador do dano nas proteínas (Halliwell; Gutteridge, 1999; Murussi et al., 2014).

Como contraponto, em virtude dos danos causados pelas ERs, o organismo lança mão de compostos antioxidantes que podem ser produzidos por ele próprio, ou serem adquiridos pela dieta, uma vez que estas moléculas, mesmo em pequenas concentrações, ajudam a neutralizar e reparar os danos causados pelo estresse oxidativo (Ribeiro et al.,

2005). Segundo Barbosa et al. (2010), os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os enzimáticos estão as enzimas produzidas pelo organismo que agem em conjunto de forma a converter as ERs em espécies menos reativas. Já os não enzimáticos são caracterizados por substâncias ingeridas pela dieta, por suplementação, ou ainda produzidas pelo organismo, destacando-se a glutatona reduzida (GSH) e o ácido úrico, entre outros (Schneider; Oliveira, 2004).

Quando a produção de ERs supera a capacidade de ação dos antioxidantes, é favorecida a oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados nos tecidos ou no sangue. Tais marcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídeos, proteínas e Ácido Desoxirribonucleico (DNA), os primeiros aqueles de maior expressão (Mayne, 2003; Halliwell; Whiteman, 2004). Outra forma de abordar a avaliação do estresse oxidativo é a que emprega métodos indiretos como os realizados neste estudo, não necessitando a realização de técnicas invasivas para a detecção da ocorrência de estresse oxidativo em humanos (Huang et al., 2005; Barbosa et al., 2010).

Sendo assim, alterações em sistemas biológicos relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, dentre eles o tabaco (Labaer, 2005; Vasconcelos et al., 2007) podem ser avaliados por meio de marcadores biológicos. Peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas são comumente utilizadas como biomarcadores para avaliar o dano em lipídeos e proteínas relacionado ao estresse oxidativo (Almroth et al., 2005). Já os níveis de GSH e ácido úrico são considerados marcadores da utilização de mecanismos antioxidantes pelo organismo. Assim, considerando a possibilidade de aumento na incidência de patologias ocasionadas pelo tabagismo, em decorrência da alteração dos níveis do estresse oxidativo, e pelo fato de que não há estudos até o momento com esta abordagem, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil oxidativo e antioxidante de indivíduos fumantes crônicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Trata-se de um estudo transversal observacional descritivo. Após a elaboração do projeto de pesquisa, este foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Cruz Alta – Unicruz –, sob o protocolo nº 07956812.2.0000.5322. Todos os participantes desta pesquisa expressaram por escrito seu consentimento, pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Além disso, responderam a um questionário informativo, que foi utilizado para a estruturação dos grupos estudados. Assim, a partir dos dados fornecidos pelos participantes, foram selecionados dez fumantes crônicos, que fumavam por pelo menos 15±8,1 anos (média±DP) e consomem 17,40 ±9,891 (média±DP) cigarros por dia (Grupo 1), e dez indivíduos saudáveis (Grupo Controle) que nunca haviam fumado e não conviviam com pessoas que fumavam, e, dessa forma, raramente eram expostos a fumaça de cigarro.

Todos os indivíduos eram do sexo masculino, com idades entre 22 e 59 anos. Foram excluídos desta pesquisa indivíduos com patologias crônicas, como sífilis, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Sida), diabetes, aterosclerose; que ingeriam suplementos vitamínicos, usuários de drogas e os sujeitos que estivessem em fase de tratamento para o abandono do cigarro.

As coletas das amostras de sangue foram realizadas por meio da punção venosa, com o uso de vacutainers contendo *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA). Na sequência as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos para realização das determinações analíticas.

Determinações analíticas

Lipoperoxidação (LPO)

Foi realizada a partir da determinação dos níveis de Tbars, de acordo com a técnica descrita por Jentsch et al. (1996), em que se utiliza ácido ortofosfó-

rico e ácido tiobarbitúrico (TBA). Posteriormente, as amostras foram incubadas em 95°C durante 45 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro visível, em 532 nm. Os resultados foram expressos por nmol MDA/mL de plasma.

Proteínas Carboniladas

Foi realizada a partir da técnica descrita por Levine et al. (1990), em plasma, tendo sido utilizado ácido tricloroacético (TCA) 10%, ácido clorídrico, 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH) e dodecil sulfato de sódio (SDS) 3%. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, em 370 nm. Os resultados foram expressos por nmol carbonil/mg proteína. A determinação de Proteínas Totais foi realizada pela metodologia estabelecida pelo kit comercial da marca Labtest®.

Glutationa reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram mensurados de acordo com o método de ensaio espectrofotométrico para a determinação da glutatona reduzida, que envolve a oxidação da GSH pelo reagente sulfidrilo 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar o derivado amarelo ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico (TNB), medido em 412 nm (Rahman; Kode; Biswas, 2006).

Ácido úrico

Realizado conforme normas técnicas do fabricante do kit comercial Labtest® produzido para a determinação de ácido úrico em plasma. Os resultados foram expressos por mg/dL.

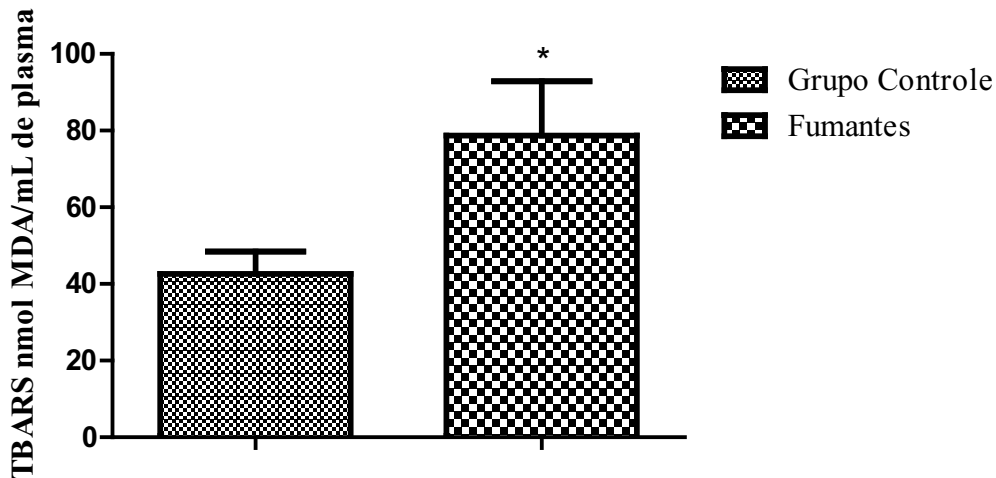
Análise estatística

Os dados com distribuição normal foram analisados por teste *t*-student, para determinações paramétricas, utilizando o programa estatístico Graph Pad prism 5. Os valores com $P < 0.05$ foram considerados significativamente diferentes para todas as análises.

RESULTADOS

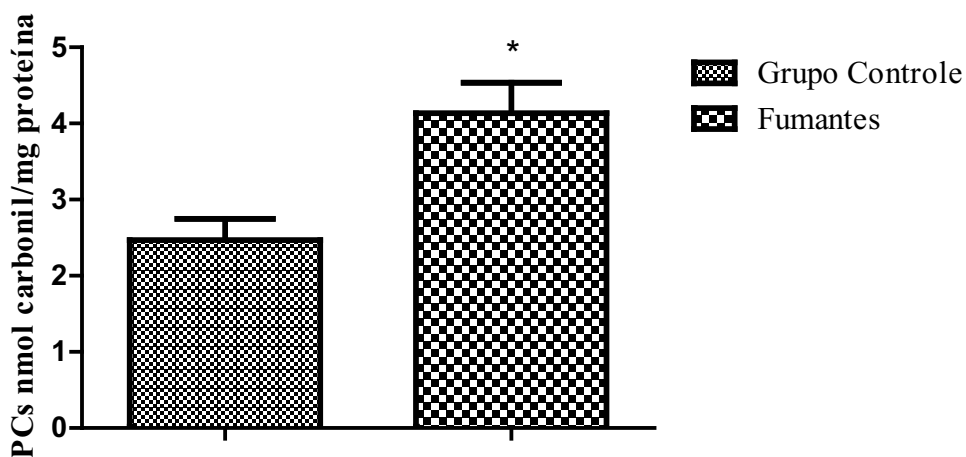
Na Figura 1 está apresentado os níveis de peroxidação lipídica de indivíduos fumantes crônicos e do grupo controle. Este último mostrou

Figura 1 – Níveis de Tbars (nmol MDA/mL de plasma) de indivíduos fumantes crônicos e do grupo controle. Os resultados foram expressos por média \pm EP (n=10), $P < 0,0381$



Já na Figura 2 verifica-se os níveis de proteínas carboniladas no plasma de indivíduos fumantes crônicos e do grupo controle. Este mostrou resultado

Figura 2 – Níveis de proteínas carboniladas (nmol carbonil/mg proteína) no plasma de indivíduos fumantes crônicos e do grupo controle. Os resultados foram expressos por média \pm EP (n=10), $P < 0,0196$



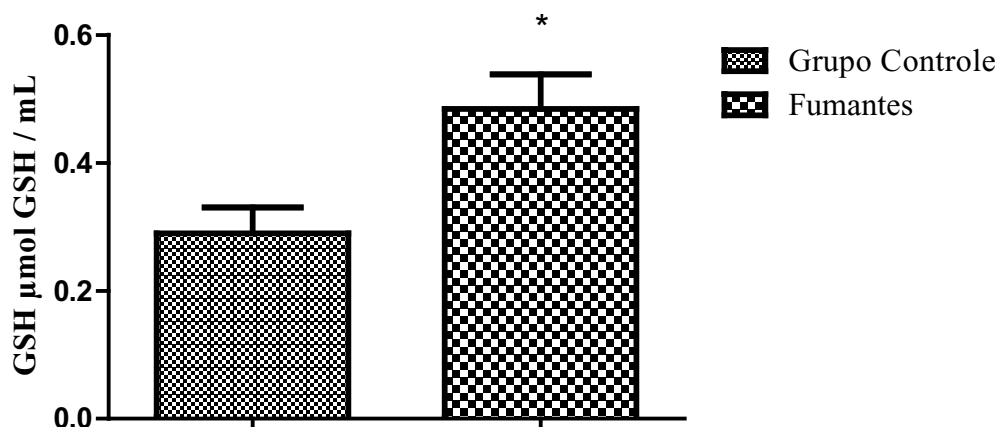
A Figura 3 mostra os níveis de GSH no plasma de indivíduos fumantes crônicos e do grupo controle. O grupo controle mostrou resultado estatística-

resultado estatisticamente significativo quando comparado com o grupo de fumantes ($P < 0,0381$).

estatisticamente significativo quando comparado com o grupo de fumantes ($P < 0,0196$).

mente significativo quando comparado com o grupo de fumantes ($P < 0,0260$).

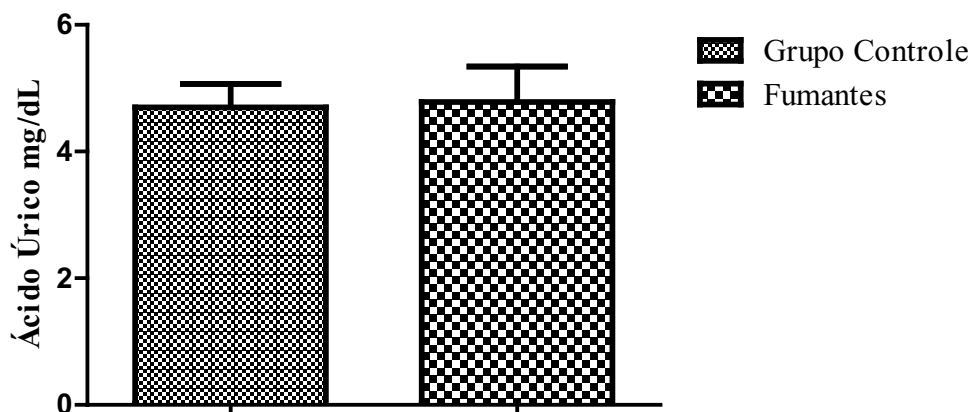
Figura 3 – Níveis de GSH ($\mu\text{mol GSH/mL}$) no plasma de indivíduos fumantes crônicos e do grupo controle. Os resultados foram expressos por média \pm EP ($n=10$), $P < 0,0260$



Por fim, na Figura 4 observa-se os níveis de ácido úrico no plasma de indivíduos fumantes crônicos e do grupo controle. O grupo controle não mostrou

diferença estatística quando comparado com o grupo de fumantes ($P < 0,7084$).

Figura 4 – Níveis de ácido úrico (mg/dL) no plasma de indivíduos fumantes crônicos e do grupo controle. Os resultados foram expressos por média \pm EP ($n=10$), $P < 0,7084$



DISCUSSÃO

De acordo com os resultados encontrados neste estudo verificou-se que os níveis de Tbars dos fumantes crônicos estudados mostraram ser significativamente superiores aos níveis de Tbars do grupo controle (Figura 1). Este fato evidencia maiores chances de desenvolvimento de doenças respiratórias, cânceres de pulmão, assim como doenças

cardiovasculares, tendo em vista que a peroxidação lipídica é um processo em que os lipídeos da membrana celular são degradados por oxidação, e que esse fato pode resultar no rompimento celular, contribuindo para o aparecimento de problemas metabólicos (Bianchi; Antunes, 1999; Barbosa et al., 2010). O estudo realizado por Yildirim et al. (2011), que avaliou o estresse oxidativo em esco-

lares fumantes passivos, mediante a realização de capacidade antioxidante total (CAT), estado oxidante total (EOT), índice de estresse oxidativo (IEO) e cotinina, também evidenciou, por meio da avaliação do EOT, um indício preciso de peroxidação lipídica e de estresse oxidativo nos indivíduos que possuíam contato com a fumaça do cigarro. Da mesma forma, Júnior et al. (2005) relaciona em seus estudos o aumento do Tbars, em decorrência do aumento de EROs e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) em pacientes asmáticos crônicos quando os comparou com um grupo controle (sem problemas respiratórios). De acordo com este mesmo autor, a asma é uma doença respiratória caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas e está diretamente relacionada ao hábito de fumar, posto que a exposição à fumaça do cigarro pode levar ao desenvolvimento de doenças respiratórias como a asma pelo aumento na produção de ERs, causando muitas alterações fisiopatológicas.

Com relação aos níveis de proteínas carboniladas, o presente estudo também revela níveis superiores no grupo de fumantes em comparação ao grupo controle (Figura 2). Este fato indica que os fumantes crônicos estudados apresentam danos oxidativos em proteínas, provavelmente induzidos por ERs, provenientes do consumo de cigarro. Este resultado corrobora com os achados de Silva (2008), posto que este autor detectou em seu estudo a associação do aumento da lipoperoxidação e oxidação proteica em pacientes asmáticos.

Pode-se observar, ainda, que os níveis de GSH também estão mais elevados no grupo de fumantes em comparação ao grupo controle (Fig. 3). Considerando que, de acordo com Oliveros, Videla e Gimenez (2004), as células de mamíferos respondem ao estresse oxidativo por meio de vários mecanismos, incluindo a produção de GSH, e Júnior et al. (2005) afirmam que esta situação oxidativa pode ocorrer com a exposição à fumaça do cigarro em decorrência do aumento das EROs e/ou ERNs, este achado sugere que o aumento na produção de GSH ocorreu em consequência da elevação da produção das ERs, provavelmente induzida pelo consumo de cigarro.

Da mesma forma que a GSH, o ácido úrico também aumenta em situações de estresse oxidativo para ajudar na proteção contra as EROs e/ou ERNs (Barreiros; David; David, 2006; Schneider et al., 2009). Neste estudo, no entanto, os níveis de ácido úrico não se mostraram significativamente alterados no grupo dos indivíduos fumantes quando foi comparado com o grupo controle, visto que ambos estão dentro dos parâmetros normais (2,5 a 7mg/dL) (Figura 4). Esse fato, porém, não descarta a ocorrência de estresse oxidativo nos fumantes crônicos, uma vez que todos os outros resultados encontrados nesta pesquisa evidenciam claramente uma situação de peroxidação lipídica e oxidação proteica excessiva, bem como a elevação da GSH, o principal componente do sistema antioxidante não enzimático.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos confirmam que o tabagismo é responsável por desencadear alterações nos marcadores de estresse oxidativo, o que pode estar relacionado à maior suscetibilidade que os fumantes crônicos têm de desenvolver patologias, como o câncer e infecções respiratórias.

REFERÊNCIAS

- ALMROTH, B. C. et al. Oxidative damage in eelpout *Zoarces viviparus*, measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, v. 73, n. 2, p. 171-180, 2005.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BIALOUS, S. A. et al. A resposta da indústria do tabaco à criação de espaços livres de fumo no Brasil. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 27, p. 283-290, 2010.

- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 12, p. 123-130, 1999.
- DUARTE, R. L. M.; PASCHOAL, M. E. M. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 32, n. 1, p. 56-65, 2005.
- GIUSTI, A. L. Interferência do tabaco no sistema imunitário – estado atual e perspectivas – revisão da literatura. *ConScientia e Saúde*, v. 6, n. 1, p. 155-163, 2007.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1999. p. 543.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Brazilian Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.
- HUANG, D. et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, 2005.
- JENTZSCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, Free Radical. *Biology & Medicine*, v. 20, n. 2, p. 251-256, 1996.
- JÚNIOR, D. R. A. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.
- LABAER, J. So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). *Journal of proteome research*, v. 4, n. 4, p. 1.053-1.059, 2005.
- LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 464-478, 1990.
- MARTINI, D. Z. et al. Efeito da exposição à fumaça do cigarro sobre parâmetros comportamentais e peroxidação lipídica em camundongos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 9, n. 3, p. 229-234, 2011.
- MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 933-940, 2003.
- MURUSSI, C. et al. Changes in oxidative markers, endogenous antioxidants and activity of the enzyme acetylcholinesterase in farmers exposed to agricultural pesticides – a pilot study. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 44, n. 7, p. 1.186-1.193, 2014.
- OLIVEROS, L. B.; VIDELA, A. M.; GIMENEZ, M. S. Effect of dietary fat saturation on lipid metabolism, arachidonic acid turnover and peritoneal macrophage oxidative stress in mice. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 37, n. 3, p. 311-320, 2004.
- RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, p. 3.159-3.165, 2006.
- RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.
- SCHNEIDER, C. D. et al. Efeito do exercício de ultrarresistência sobre parâmetros de estresse oxidativo. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 15, n. 2, p. 89-92, 2009.
- SILVA, E. C. *Avaliação do estresse oxidativo em adolescentes com asma e rinite*. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2008.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1.323-1.338, 2007.
- YILDIRIM, F. et al. Increased oxidative stress in preschool children exposed to passive smoking. *Jornal de pediatria*, v. 87, n. 6, p. 523-528, 2011.

Recebido em: 17/12/2014

Aceito em: 10/3/2015