



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOANÁLISES

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO NO LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

TATIANA XAVIER DA COSTA

ORIENTADORA: Dra. Telma Maria de Araújo Moura Lemos

**NATAL
2009**

TATIANA XAVIER DA COSTA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO NO LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

Dissertação submetida ao programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRN, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Bioanálises e Medicamentos.

**NATAL
2009**

TATIANA XAVIER DA COSTA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO NO LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Telma Maria Araújo Moura Lemos - UFRN

Orientadora

Profa. Dra. Maria José Pereira Villar - UFRN

1º Examinador (Membro interno)

Prof. Dr. Alexandre Donizeti Martins Cavagis - UNICAMP

2º Examinador (Membro externo)

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma tarefa difícil, principalmente, quando se deseja citar nomes, pois corremos o risco de omitir alguém diante da quantidade de pessoas que colaboraram na realização desse trabalho. Mas, mesmo assim, desejo correr esse risco e agradecer a algumas pessoas que contribuíram e apoiaram para que esse trabalho fosse realizado. Em especial, à minha orientadora Dra. Telma Maria Araújo Moura Lemos, que se fez presente em todas as etapas da realização do mesmo, incentivando o seu desenvolvimento, atuando como orientadora e também amiga, mostrando sua enorme capacidade ao saber cobrar e também compreender.

À professora Dra. Maria das Graças de Almeida, que está sempre empenhada em ajudar no desenvolvimento das pesquisas, se esforçando para que haja uma estrutura adequada para realização das mesmas e contribuindo imensamente para a Pós-graduação, e ainda à Dra. Maria José Pereira Villar, que possibilitou o acesso às pacientes incluídas neste trabalho.

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, representado pela coordenadora professora PhD. Adriana Resende, que possibilitou o acesso para a realização dessa Pós-graduação e está sempre buscando a melhoria da estrutura do programa.

Gostaria de agradecer a todos os amigos do LABMULT, principalmente, a Francisco Paulo Freire Neto, pelo auxílio imprescindível à realização dos experimentos, e também à Ms. Melina Bezerra Loureiro, Marcela Abott Galvão Ururahy, Ms. Rand Randall, Ulisvaldo Brunno de Oliveira Macedo, Teresa Cristina P. da Silva e Ms. Karine Cavalcanti Maurício de Sena, pela troca de conhecimentos e experiências que engradeceram, não só o trabalho, mas a mim como pessoa.

Gostaria de agradecer aos alunos de iniciação científica que contribuíram diretamente de forma muito importante e estiveram ao meu lado desde o início do trabalho me auxiliando na realização dos experimentos: Amanda Costa Bandeira, Ana Rachel Freitas Barbosa, Dalliane Macedo Lopes de Oliveira, Matheus Aurélio Silva Freitas e a Sarah Rachel Ferreira da Silva. Gostaria de deixar meu

agradecimento a todos os outros alunos que auxiliaram nos experimentos. Muito obrigada! Vocês foram muito importantes!

Gostaria de agradecer ainda a todos os meus amigos da Maternidade Escola Januário Cicco-UFRN, que souberam compreender a ausência e me apoiaram na realização desse trabalho, em especial a Ilson Minora de Almeida, que mostrou sua grandeza ao compreender a importância da realização desse mestrado.

Gostaria de agradecer também às professoras Ms. Tereza Neuma de Sousa Brito e a Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros, que desde a graduação se mostraram empenhadas no aprendizado dos alunos. À professora Ms. Tereza Neuma, agradeço pela companhia na coleta das amostras e à professora Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros agradeço por ceder o laboratório de hematologia para realização de análises.

Agradeço ainda a todos os funcionários da faculdade que contribuíram de forma simples, mas que se mostraram essenciais em alguns momentos para que o trabalho tivesse continuidade. A todos os pacientes e voluntários saudáveis que entenderam e participaram da realização do trabalho.

Gostaria de encerrar agradecendo a Deus, por me proporcionar perseverança e sabedoria para a realização de mais esse desafio. Sem ele nada seria possível!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus familiares, principalmente, a meus pais: Inêz Maria Xavier da Costa e Heronides Ferreira da Costa, que sempre me incentivaram a não parar de buscar o conhecimento, estendo sempre ao meu lado me apoiando diante das dificuldades, torcendo e comemorando comigo as minhas vitórias. Considerem a conclusão deste trabalho mais uma vitória que dedico a vocês!

Dedico também a meus irmãos Bruno Xavier da Costa e Juliana Xavier da Costa com quem aprendo muito e que também estão sempre me ajudando quando preciso. Dedico este trabalho a meu namorado, Alex Matos de Albuquerque, que soube não apenas compreender a importância da sua realização, mas foi muito importante ao me incentivar, ser um amigo, um companheiro e também um exemplo de inteligência e de paciência o qual procurei seguir.

Dedico também a todos aqueles que, direta ou indiretamente me apoiaram e incentivaram para a conclusão do mesmo.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original"

(Albert Einstein)

RESUMO

OBJETIVO: Analisar os parâmetros de estresse oxidativo no Lúpus Eritematoso Sistêmico. **PACIENTES E MÉTODOS:** Foram realizadas as determinações do conteúdo de glutatona reduzida no sangue total, da atividade da superóxido dismutase, da glutatona peroxidase e da catalase nos eritrócitos e da concentração de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico no plasma de 19 pacientes do sexo feminino com LES sem atividade de doença (Mex-SLEDAI < 2), com média de idade de 32 ± 11 anos, através de métodos espectrofotométricos e comparada a um grupo de 30 indivíduos sadios nas mesmas condições. As pacientes com LES apresentaram tempo de doença em torno de 5 ± 3 anos. Os dados estatísticos foram analisados através do teste t-student considerando um nível de significância de $P < 0,05$. **RESULTADOS:** Foi verificado que a concentração de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico foi significativamente mais elevada e a atividade da catalase foi significativamente diminuída nos pacientes com LES em comparação ao controle. Não houve diferença significativa nos outros parâmetros. **CONCLUSÃO:** O aumento da peroxidação lipídica e a diminuição da atividade da catalase sugerem que o estresse oxidativo tem um papel na patogênese da doença no LES, mesmo em pacientes sem doença ativa.

PALAVRAS-CHAVE : Lúpus Eritematoso Sistêmico, Estresse oxidativo, Espécies Reativas do Oxigênio, Antioxidantes.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of this work was to analyse some oxidative stress parameters in patients of Systemic Lúpus Erythematosus. **PATIENTS AND METHODS:** Determinations of reduced glutathione content in whole blood were carried out. The activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in erythrocytes and the concentration of reactive substances of acid thiobarbituric in plasma of patients female (n =19) with SLE no activity of disease (Mex-SLEDAI < 2), with average ages of 32 ± 11 years, through the spectrophotometrical methods and from healthy individuals (n =30). Statistical data were analyzed by student *t*-test, $p < 0,05$. **RESULTS:** Our data indicated a significant decrease on the activity of catalase and significant increase on the concentration of reactive substances of acid thiobarbituric in patients with SLE comparing with healthy individuals. There was no significant difference in other parameters. **CONCLUSION:** The results showed that oxidative stress has a role in the pathogenesis of the disease in SLE, even in patients without active disease.

KEY-WORDS: Systemic Lupus Erythematosus, Oxidative Stress, Reactive Oxygen Species, Antioxidants.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA	Anticorpos anti-nucleares
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
Cu-Zn SOD	Superóxido dismutase cobre zinco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DS-DNA	Ácido desoxirribonucléico de hélice dupla
DTNB	Ácido 5,5'- ditio-bis-(2- nitrobenzóico)
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
EV	Endovenoso
GO	Glutaciona oxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GPX	Glutaciona peroxidase
GSHt	Glutaciona total
GSSG	Glutaciona oxidada
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorídrico
HLA	Antígeno leucocitário humano
IL	Interleucina
INF	Interferon
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MDA	Malondialdeído
Mn-SOD	Superóxido dismutase manganês
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
O_2^-	Superóxido
1O_2	Oxigênio singlete
OH^-	Radical hidroxila
SD	Desvio padrão
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
SRAT's	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TNB	Tiolato
TNF	Fator de necrose tumoral
VR	Valor de referência

LISTA DE FIGURAS

FIGURA. 1. Formação de EROs a partir do oxigênio molecular.....	21
FIGURA. 2. Célula sofrendo ação de radicais livres	22
FIGURA. 3. Diagrama mostrando a geração de EROs e os principais mecanismos antioxidantes	24
FIGURA. 4. Interconversão da GSH e GSSG pela ação das enzimas GPx, GO e GR	26
FIGURA. 5. Biossíntese da glutathione	26
FIGURA. 6. Esquema da metodologia utilizada na coleta	36
FIGURA. 7. Esquema da metodologia utilizada nas análises bioquímicas.....	38
FIGURA. 8. Reação entre a GSH e o 5,5'- ditio-bis-(2-nitrobenzólico) (DTNB).....	40
FIGURA. 9. Esquema da metodologia utilizada nas análises laboratoriais.....	41
FIGURA. 10. Reação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA).....	44
FIGURA. 11. Resultados da determinação da atividade da SOD nos eritrócitos dos indivíduos.....	49
FIGURA. 12. Resultados da determinação da atividade da GPx nos eritrócitos dos indivíduos.....	50
FIGURA. 13. Resultados do conteúdo de GSH no sangue total dos indivíduos participantes do estudo...	51
FIGURA. 14. Resultados da determinação da atividade da CAT nos eritrócitos dos indivíduos.....	52
FIGURA. 15. Resultados da concentração de SRAT's no plasma dos indivíduos.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA. 1. Dados demográficos das pacientes com LES e do grupo controle.....	47
TABELA. 2. Perfil bioquímico das pacientes com LES e do grupo controle.....	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. EPIDEMIOLOGIA DO LÚPUS	15
2.1.1. Prevalência e incidência	15
2.1.2. Patogênese	15
2.1.3. Prognóstico	16
2.1.4. Diagnóstico	17
2.1.5. Tratamento	17
2.1.6. Envolvimento genético no LES	18
2.1.7. Avaliação da atividade da doença no LES	19
2.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS: ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO	20
2.2.1. Estresse oxidativo e Espécies Reativas do Oxigênio	20
2.2.2. Antioxidantes	22
2.2.3. Lipoperoxidação	28
2.3. ESTRESSE OXIDATIVO NO LES	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVOS GERAIS	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. METODOLOGIA	33
4.1. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	33
4.2. CASUÍSTICA	33
4.2.1. População de estudo	33
4.2.2. Critérios de inclusão e de exclusão no estudo	33
4.2.3. Grupo controle	34
4.2.4. Grupo de estudo	34

4.3. METODOLOGIA	34
4.3.1. Obtenção do material biológico	34
4.3.2. Análises laboratoriais	35
4.3.2.1. Dosagens bioquímicas	37
4.3.2.2. Análises dos parâmetros de estresse oxidativo	39
4.3.2.3. Dosagem de hemoglobina	45
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
APÊNDICE.....	62
ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

O **Lúpus Eritematoso Sistêmico** (LES) é uma desordem multigênica de etiologia desconhecida (POLLARD; HULTMAN; KONO, 2005). É considerada uma doença autoimune sistêmica típica e está associada com a produção de uma variedade de auto-anticorpos, incluindo anticorpos antinucleares (ANA) dirigidos contra macromoléculas contendo ácidos nucléicos, como a cromatina ou partículas de ribonucleoproteína, que são constantemente liberados no meio extracelular como resultado da apoptose (BOULÉ et al., 2004). Do ponto de vista imunopatológico, é o protótipo de doença imune por imunocomplexos, caracterizando-se pelos danos teciduais causados por auto-anticorpos patogênicos, imunocomplexos e linfócitos T, numa complexa interação que, até hoje, não foi completamente elucidada (MOREIRA; CARVALHO, 2001).

O LES é encontrado em todo o mundo, e sua prevalência oscila de 15-50/ 100.000 habitantes (MOREIRA; CARVALHO, 2001). A cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil parece ter a maior incidência de LES já descrita na literatura: 8,7 casos novos/ 100 mil habitantes/ ano, em estudo realizado no ano de 2000 (VILAR; SATO, 2002).

Embora a patogênese do LES seja multifatorial com influências endógenas e exógenas, a inflamação natural durante os períodos de exacerbação, implica a possibilidade de existência de estresse oxidativo nessa patologia (EVANS et al., 2000). Apesar disso, existem poucos estudos em humanos que demonstrem as implicações do estresse oxidativo no LES. Dessa forma, estudos adicionais são necessários e importantes para uma melhor compreensão e esclarecimento do envolvimento desses agentes na patogênese do LES. Sendo assim, propusemos nesse estudo, a avaliação de alguns parâmetros de estresse oxidativo no LES.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DO LÚPUS

2.1.1. Prevalência e incidência

Estima-se que a prevalência do LES é de 1/2000 indivíduos (MARTINS; CARVALHO; SOARES, 2000), não possuindo distribuição uniforme em todos os grupos raciais. Sexo, idade, raça e situação socioeconômica podem ter influência na manifestação da doença. A doença acomete predominantemente o sexo feminino (9:1), embora esta proporção seja menos marcante (3:1) quando se inicia antes da puberdade ou na mulher idosa (MOREIRA; CARVALHO, 2001). Portanto, essa patologia afeta, predominantemente, mulheres, em idade reprodutiva (CROKER; KIMBERLY, 2005). Em estudo realizado por Vilar; Sato (2002) foi verificada uma das maiores incidências de LES descrita na literatura descrita na literatura como: 8,7 casos novos/ 100 mil habitantes/ ano na cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

A relação da incidência entre mulheres e homens varia de 4,3 a 13,6. O estrógeno parece ser estimulante dos linfócitos e da resposta imune. Mulheres portadoras de LES parecem produzir o metabólito 16α a partir da hidroxilação do estrógeno, que ainda possui atividade estrogênica. Estudos demonstraram que a exposição ao estrógeno pode aumentar a incidência do LES, como ocorre no uso de contraceptivos orais ou da terapia de reposição estrogênica. No trabalho realizado por PETRI (2002), verificou-se que o LES nos homens diferiu do apresentado por mulheres. Eles sofrem de mais morbidades que as mulheres, apresentando uma frequência aumentada de trombose que tem causa provavelmente multifatorial, como a hipertensão, a insuficiência renal e a frequência aumentada do anticoagulante lúpico.

2.1.2. Patogênese

A patogênese do LES está associada tanto com predisposições genéticas quanto com influências ambientais, resultando em uma quebra da homeostasia imunológica, levando à indução e produção de auto-anticorpos, incluindo anticorpos anti-nucleares, que particularmente irão dirigir-se a macromoléculas constituídas por ácidos nucléicos, como

partículas de ribonucleoproteína (QING; PUTTERMAN, 2004; SCOFIELD et al., 2005; ROVENSKY et al., 2007). Os imunocomplexos existentes no LES formam-se na circulação ou *in situ*, sendo responsáveis pelas manifestações clínicas características da inflamação de múltiplos órgãos, tais como nefrite, artrite e vasculite e, portanto, responsáveis pelo dano a esses órgãos (BAVE et al., 2003).

A perda de tolerância aos antígenos nucleares e outros componentes próprios é mencionada como mecanismo contribuinte para a formação de auto-anticorpos e imunocomplexos, assim como o decréscimo da depuração de imunocomplexos e a ativação anormal das células B e T (FINE, 2005). A tolerância imunológica pode ser afetada pela diminuição do limiar de ativação dos linfócitos, devida a mutações em genes críticos para o processo de tolerância ou alterações em genes da maquinaria apoptótica, que seriam responsáveis pela não deleção de linfócitos auto-reativos (TSUKUMO; YASUTOMO, 2004).

2.1.3. Prognóstico

No início do século passado, o LES era considerado uma doença progressiva e de curso geralmente fatal. Mas, ao longo do tempo, observa-se um aumento na taxa de sobrevivência, apesar da taxa de mortalidade ainda ser aproximadamente três vezes à da população normal de mesmo sexo e faixa etária. Isto indica que esses pacientes apresentam uma morte mais precoce que a população geral, embora ela possa estar ocorrendo mais tardiamente em relação ao curso da doença. Essa mudança pode ser explicada pela inclusão nos diagnósticos de LES, não somente dos casos fatais e fulminantes, mas também dos casos remitentes crônicos (BORCHERS et al., 2004). Segundo Petri (2002), existe uma preocupação que a tendência – identificação do LES mais leve, ou o diagnóstico mais precoce do LES possa explicar um aumento aparente na incidência dessa patologia.

Fatores como raça negra, desenvolvimento de glomerulonefrite e baixo nível sócio-econômico têm sido apontados como indicadores de um pior prognóstico (MARTINS; CARVALHO; SOARES, 2000). As diferenças raciais podem ocorrer por um fator genético, mas estudos sugerem que variáveis sócio-econômicas podem afetar a falha renal. O estudo

LUMINA encontrou que a pobreza, mais do que a raça por si só, era uma variável explicativa para a mortalidade precoce (PETRI, 2002).

Atualmente, 90% dos pacientes sobrevivem por, pelo menos dois anos após o diagnóstico, diferentemente do que ocorria há trinta anos, quando apenas 50% dos pacientes sobreviviam tanto. Hoje, na realidade, 80% sobrevivem dez anos, e 65%, vinte anos após o diagnóstico. Normalmente, metade dos pacientes que morrem de LES, morrem nos primeiros cinco anos de doença, devido a complicações da doença ativa, e metade morre de dez a vinte anos depois do diagnóstico, devido a complicações da doença crônica ou do tratamento (MOREIRA; CARVALHO, 2001).

2.1.4. Diagnóstico

Na prática, costuma-se estabelecer o diagnóstico de LES utilizando os critérios de classificação propostos pelo American College of Rheumatology (ACR) (ANEXO A), que se baseia na presença de pelo menos quatro critérios dos onze citados a seguir: eritema malar, lesão discóide, fotossensibilidade, úlceras orais/nasais, artrite não-erosiva, serosite (pleurite, pericardite), comprometimento renal (proteinúria persistente, cilindrúria), alterações neurológicas, alterações hematológicas (anemia, leucopenia, plaquetopenia), alterações imunológicas (anti-DNA, anti-Sm, VDRL falso-positivo) e anticorpos antinucleares. De particular importância para o diagnóstico de LES é a presença de anticorpos ou fatores antinucleares (FAN) por imunofluorescência indireta (IFI), utilizando como substrato as células HEp-2. A positividade deste teste, embora não específica para o diagnóstico de LES, serve como triagem, em virtude de sua alta sensibilidade (maior que 95%) e alto valor preditivo negativo (SATO et al., 2002). Essa doença está associada comumente com períodos de exacerbações, seguidas de períodos de remissão (CROKER; KIMBERLY, 2005).

2.1.5. Tratamento

Atualmente, não há medicamentos que proporcionem a cura do LES. Aqueles que estão disponíveis protegem os órgãos da agressão inflamatória provocada pelos desarranjos no sistema imune e induzem a remissão da doença, mas não impedem ou revertem a falha

inicial do sistema imunológico, que ainda não está completamente esclarecida (MOREIRA; CARVALHO, 2001).

O tratamento deve ser individualizado e dependerá do órgão ou sistemas acometidos e da gravidade desses acometimentos. Em pacientes com acometimento de múltiplos sistemas, o tratamento deve ser orientado para o mais grave. Quando houver manifestação que não responda a um medicamento, pode ser necessário fazer uso simultâneo de diversos medicamentos (SATO et al., 2002).

Os pulsos intravenosos de metilprednisolona são frequentemente usados para tratamento de manifestações severas no LES. A prednisona oral é o glicocorticoide mais utilizado no tratamento de pacientes com LES, sendo utilizado na dose de 7-15mg /dia no tratamento de sintomas moderados. Altas doses de prednisona 1-1,5 mg/kg melhoram a sobrevivência de pacientes com LES severo (BADSHA et al., 2003). O uso de corticóides em forma de “pulso” ou bolus (10 a 15 mg/ kg/ metilprednisolona/ EV/ dia/ 3 dias consecutivos), em associação com o mesmo tipo de administração da ciclofosfamida, tem valor comprovado na glomerulonefrite proliferativa difusa (MOREIRA; CARVALHO, 2001). Independentemente do órgão ou sistema afetado, o uso contínuo de antimaláricos como 4 mg/kg/dia de difosfato de cloroquina ou 6 mg/kg/dia de sulfato de hidroxicloroquina é indicado com a finalidade de reduzir atividade da doença e tentar poupar o uso de corticóides (SATO et al., 2002).

2.1.6. Envolvimento genético no LES

A base genética do LES é muito complexa, sendo estimado que mais de 100 genes estejam envolvidos com a susceptibilidade ao LES. Há uma forte associação genética das regiões DR2 e DR3 do antígeno leucocitário humano (HLA) com o risco relativo de aproximadamente 2.0, associado ao desenvolvimento do LES em diferentes populações raciais. Recentemente, polimorfismos no gene para fator 5 regulatório do interferon (IRF5) e proteína tirosina fosfatase N22 (PTPN22) tem sido associados com o aumento do risco para LES, fornecendo novos mecanismos para elucidar a susceptibilidade e patogênese a essa doença (SIMARD; COSTENBADER, 2007).

A susceptibilidade genética para o desenvolvimento de LES é herdada como um traço complexo e estudos têm sugerido que vários genes podem ser importantes. Em particular, uma deleção no braço longo do cromossomo 1 (1q23-24) está relacionada com o LES em muitas populações (D'CRUZ, 2007).

2.1.7. Avaliação de atividade da doença no LES

Diversas medidas têm sido desenvolvidas para avaliar a atividade, a severidade e o dano cumulativo da doença no LES. A avaliação da atividade da doença é importante para o monitoramento de pacientes, direcionando as mudanças necessárias no tratamento e para avaliar o impacto da doença. Três dessas medidas validadas são o Índice de Atividade da Doença no LES (SLEDAI), o Índice de Avaliação do Grupo Britânico de LES (BILAG) e a Medida de Atividade no Lúpus Sistêmico (SLAM). Elas são largamente aceitas para a avaliação de adultos com LES. O SLEDAI é um índice cumulativo ponderado e tem 24 critérios agrupados dentro de nove sistemas (SNC, sistema vascular, renal, músculo-esquelético, seroso, dermatológico, imunológico, constitucional e hematológico). Todos os atributos são claramente definidos e contidos em um formulário simples. Os atributos presentes dentro de 10 dias para a avaliação contribuem para o score do SLEDAI. O score total para um certo atributo é dado quando as manifestações clínicas do paciente preenchem todos atributos, de outra maneira, nenhum ponto é contabilizado (BRUNNER et al., 1999).

O Mex-SLEDAI é uma versão modificada do SLEDAI, desenvolvida por Guzman et al (2002), inicialmente, para ser utilizado em países em desenvolvimento, onde a obtenção dos níveis de complemento C3 e de anticorpos anti-ds-DNA não seriam tão fáceis ou não estariam disponíveis. No Mex-SLEDAI, a atividade de doença é definida através de 10 critérios clínicos ao invés de 24, que requerem confirmação laboratorial. Os critérios avaliados no Mex-SLEDAI são os seguintes: as desordens neurológicas e renais, a vasculite, a hemólise, a miosite, a artrite, as desordens mucocutâneas, a serosite, a febre, a fadiga, além da trombocitopenia, da leucopenia e da linfopenia (ANEXO B). Ele é obtido em uma escala ordinal na qual o valor do score obtido varia de 0 a 32. Um maior valor do score, indica uma maior atividade de doença. Pacientes com score menor que 2 são classificados como sem atividade de doença, aqueles com score entre 2 e 5 são

classificados como com doença ativa provável, enquanto que aqueles com score maior que 5 são classificados com doença ativa. O Mex-SLEDAI tem uma sensibilidade de 85,7% e uma especificidade de 100% (KHANNA et al., 2004). Este estudo considerou o Mex-SLEDAI para classificar o índice de atividade de doença das pacientes com LES.

2.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS: ESTRESSE OXIDATIVO, ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E MECANISMOS ANTIOXIDANTES.

2.2.1. Estresse oxidativo e Espécies Reativas do Oxigênio

O **Estresse oxidativo** designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes. O desequilíbrio entre a formação e a remoção das Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo inclusive resultar na morte celular (JÚNIOR et al., 2001). Esse desequilíbrio é suficientemente potente para induzir risco a macromoléculas celulares, incluindo o DNA. (KARIHTALA; SOINI, 2007).

Os oxidantes são compostos capazes de oxidar moléculas através de três formas: retirada de átomos de hidrogênio, retirada de elétrons ou adição de oxigênio. Os oxidantes são divididos em grupos, dependendo de sua natureza química e reatividade (LYKKESFELDT; SVEDSEN, 2006). Dentre os oxidantes, encontram-se as **EROs**, que são produtos de uma redução parcial do oxigênio e podem ser geradas por reações enzimáticas ou não-enzimáticas dentro de células ou na membrana celular (GWINNER; GRONE, 2000). Esse termo abrange muitos tipos de metabólitos reativos do oxigênio, incluindo radicais livres, que são definidos como espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo, por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH.) e o oxigênio singlete (1O_2), e também abrange algumas moléculas que não são radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KARIHTALA; SOINI, 2007).

A ERO primária é o ânion superóxido que é formado pela redução do oxigênio molecular por um único elétron fornecido pela NADPH oxidase, que catalisa a reação. A

redução adicional do superóxido pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisada por uma família de enzimas, denominadas superóxido dismutases (SOD), que produzem o peróxido de hidrogênio. Portanto, em condições fisiológicas, uma vez formado o O_2^- a presença de H_2O_2 torna-se quase inevitável. Reações adicionais levam à formação do radical hidroxil, especialmente na presença de íons metálicos, através da reação de Fenton ou de Haber-Weiss. Os radicais hidroxil são extremamente reativos, com uma meia-vida curta, reagindo com as moléculas que encontrarem (FIG.1) (GENESTRA, 2007). Os **radicais hidroxil (OH^\cdot)** são responsáveis por mediar os principais efeitos prejudiciais das EROs em mamíferos, pois este radical tem uma estrutura muito instável sendo, por isso, considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos (KARIHTALA; SOINI, 2007)

As principais fontes endógenas geradoras de EROs incluem as mitocôndrias e a atividade de algumas enzimas como: *xantina oxidase*, *citocromo P450- Oxidase*, *monoaminoxidases*, as enzimas envolvidas na via de produção de *prostaglandinas* e *tromboxanos* e a *NADPH- oxidase* da membrana plasmática de macrófagos, que produzem uma grande quantidade de EROs em resposta ao estímulo fagocitário (JÚNIOR et al., 2001). Várias fontes exógenas de EROs também contribuem direta ou indiretamente para a carga oxidante total. Isso inclui o efeito de radiações ionizantes e não-ionizantes, poluição atmosférica e gases tóxicos, como o ozônio (LYKKESFELDT, 2007).

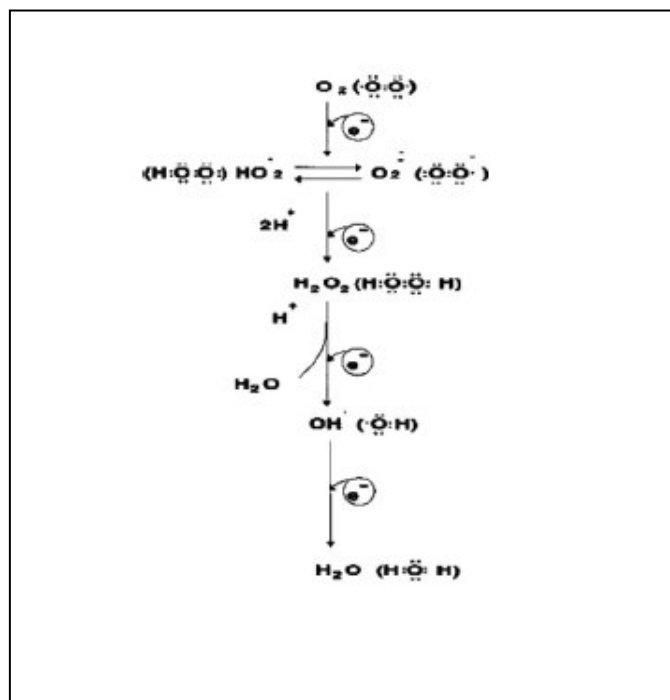


FIG.1: Formação das EROs a partir do oxigênio molecular (GENESTRA, 2007).

Pequenas quantidades de EROs são constantemente produzidas no metabolismo aeróbico e têm papel importante na fisiologia de células normais, e também na transdução de sinais. Porém, em condições fisiopatológicas com aumento dos níveis de EROs, essas moléculas tornam-se fatores relevantes para a iniciação e amplificação de processos deletérios observados na inflamação, oncogênese e em doenças degenerativas (GWINNER; GRONE, 2000).

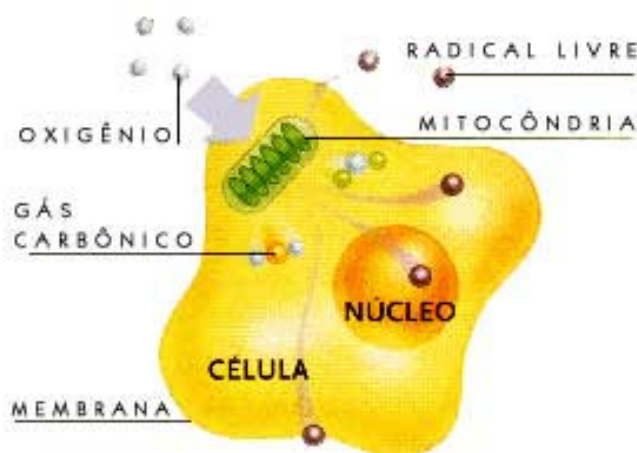


FIG.2: Célula sofrendo ação de radicais livres.

Fonte: http://www.coljoaoxxiii.com.br/portal/site/visualizar_impressao.asp?id_noticia=183307. <Acesso em 14/01/2008 às 15h11min>

2.2.2. Antioxidantes

Em condições fisiológicas normais, a produção de EROs é balanceada por um eficiente sistema antioxidante, formado por moléculas capazes de retirar as EROs do organismo, prevenindo o dano celular (TAM et al., 2005). Nesse contexto, os dois principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos: enzimáticos e não-enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathiona, particularmente a glutathiona redutase (**E.C. 1.6.4.2** – GR) e a glutathiona peroxidase (**E.C. 1.11.1.9** – GPx). Outros sistemas enzimáticos incluem a superóxido dismutase (**E.C. 1.1.15.1.1** - SOD), que catalisa conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, bem como a catalase (**E.C. 1.11.1.6** - CAT), que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (FIG.3) (JÚNIOR et al., 2001).

A SOD tem como função atuar na defesa antioxidante primária contra radicais superóxidos. O aumento da atividade da SOD corresponde com o aumento da resistência ao estresse oxidativo (URSO, 2003). Três diferentes tipos de **SOD (E.C. 1.1.15.1.1 - SOD)** são expressas por células humanas: a superóxido dismutase cobre-zinco (**CuZnSOD**), presente principalmente no citoplasma, requer os íons cobre e zinco no seu sítio ativo; o íon cobre é essencial para a atividade catalítica da enzima e o íon zinco promove a estabilidade da estrutura protéica. A superóxido dismutase mitocondrial manganês (**MnSOD**) e a superóxido dismutase extracelular (**ECSOD**) são capazes de transformar dois ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (RAHMAN, 2006; KARIHTALA; SOINI, 2007). Nos mamíferos, os níveis mais altos de CuZnSOD encontram-se no fígado, eritrócitos, cérebro e neurônios (FORSBERG et al., 2001).

A família da GPx (**E.C. 1.11.1.9 - GPx**), consiste de quatro seleno-proteínas caracterizadas por diferenças na localização e estrutura celular (CECARINI et al., 2007). A **GPx (E.C. 1.11.1.9 - GPx)** é uma enzima antioxidante que catalisa a redução de hidroperóxidos lipídicos e não-lipídicos gerados na presença de peróxido de hidrogênio, enquanto oxida a glutathione (SARBAN et al., 2005; TURGAY et al., 2007).

A **catalase (E.C. 1.11.1.6 - CAT)** é uma enzima antioxidante tetramérica que tem peso molecular de 240 kDa. (KARIHTALA; SOINI, 2007). Essa enzima constitui o mais eficiente e elaborado sistema em plantas e animais para controlar as concentrações de H_2O_2 (MONTAVON et al., 2007). A catalase (**E.C. 1.11.1.6 - CAT**) catalisa a conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 , limitando o efeito deletério do H_2O_2 (D'SOUZA et al., 2008). A catalase (**E.C. 1.11.1.6 - CAT**) é particularmente ativa no fígado, pulmão, rins e eritrócitos em humanos (CECARINI et al., 2007).

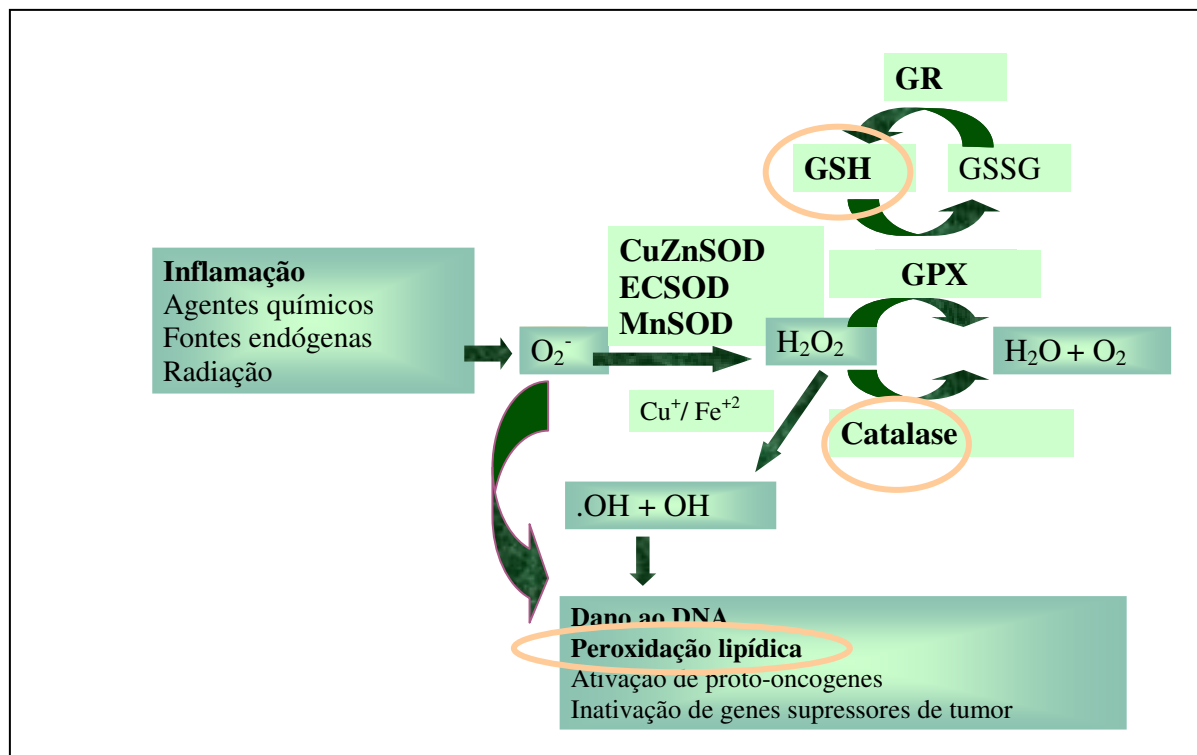


FIG.3: Diagrama mostrando a geração de EROs e os principais mecanismos antioxidantes.

FONTE: Adaptado de KARIHTALA; SOINI, 2007.

Embora os sistemas antioxidantes enzimáticos sejam considerados os mais eficientes e específicos mecanismos regulatórios do status redox celular, muitos outros sistemas **não-enzimáticos**, que incluem moléculas de baixo peso molecular também existem. Proteínas como a ceruloplasmina e transferrina, que são envolvidas no transporte de íons cobre e ferro, respectivamente, têm um papel importante na prevenção da formação dos íons hidroxil, sendo consideradas antioxidantes (KARIHTALA; SOINI, 2007). Além desses antioxidantes, outras proteínas carreadoras de metais, como a ferritina e metalotioneína estão presentes para limitar a geração de radicais OH. A defesa antioxidante é adicionalmente complementada pelas vitaminas A, E e C, **glutaciona** e pela bilirrubina, que agem eliminando as EROs (GWINNER; GRONE, 2000).

A vitamina E (α - tocoferol) é uma molécula lipossolúvel e tende a se concentrar no interior das membranas, agindo sinergicamente com o ascorbato (ácido L- ascórbico). Ambos os radicais tocoferol e hidroascorbil não são muito reativos, inviabilizando o processo de lipoperoxidação. Os carotenóides destacam-se também como agentes

antioxidantes, dentre os quais a pró-vitamina A (β - caroteno) é o carotenóide mais abundante e de maior atividade. Estudos recentes indicam uma atividade anti- cancerígena do β - caroteno, sendo usado como corante e antioxidante em alimentos (JÚNIOR et al., 2001).

A glutathiona (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) é um tripeptídeo contendo tiol, composto de cisteína, ácido glutâmico e glicina, envolvido na defesa celular antioxidante. Nas células, a glutathiona reduzida e a glutathiona oxidada constituem as formas de glutathiona livre que, associadas à fração ligada às proteínas, representam a glutathiona total (GSHt). A glutathiona livre está presente principalmente na forma reduzida, que pode ser convertida à forma oxidada durante situações de estresse oxidativo e pode ser revertida à sua forma reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase (PASTORE et al., 2003). A GSSG é formada por uma oxidação enzimática catalisada pela enzima GPx, gerando uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH (FIG.3 e 4) (CAMERA; PICARDO, 2002).

Como a glutathiona reduzida tem dificuldade em entrar no interior de células, exceto de células epiteliais, a mesma é sintetizada no meio intracelular pela ação consecutiva de duas enzimas. Como ilustrado pela reação 1, a γ - glutamylcisteína sintetase utiliza o glutamato e a cisteína como substratos, formando o dipeptídeo γ - glutamylcisteína que é então combinado com glicina na reação 2, catalisada pela glutathiona sintetase, finalmente, originando a GSH (FIG.5). O trifosfato de adenosina (ATP) é um cofator para ambas as enzimas. O nível intracelular de GSH é regulado por “feedback” inibitório da γ - glutamylcisteína sintetase (CAMERA; PICARDO, 2002).

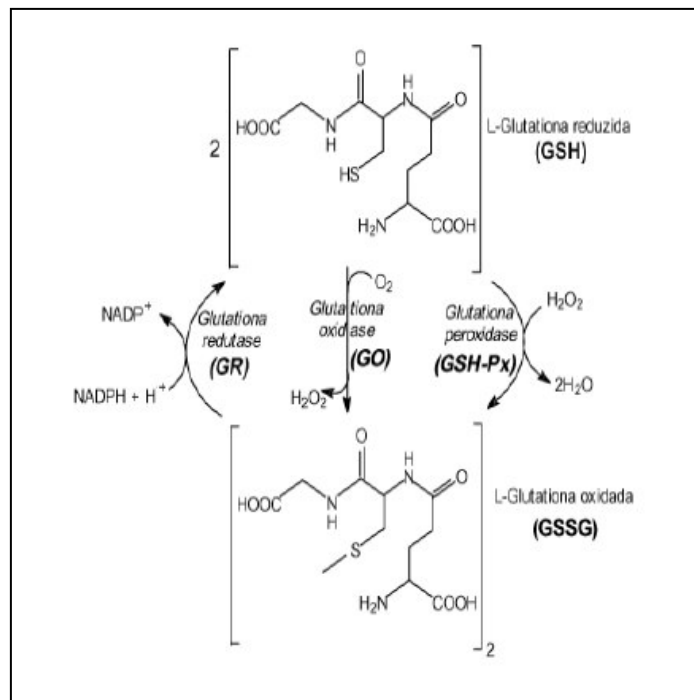


FIG.4: Interconversão da glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutationa peroxidase (GPx-E.C. 1.11.1.9), glutationa oxidase (GO) e glutationa reductase (GR E.C. 1.6.4.2).

FONTE: JÚNIOR et al., 2001.

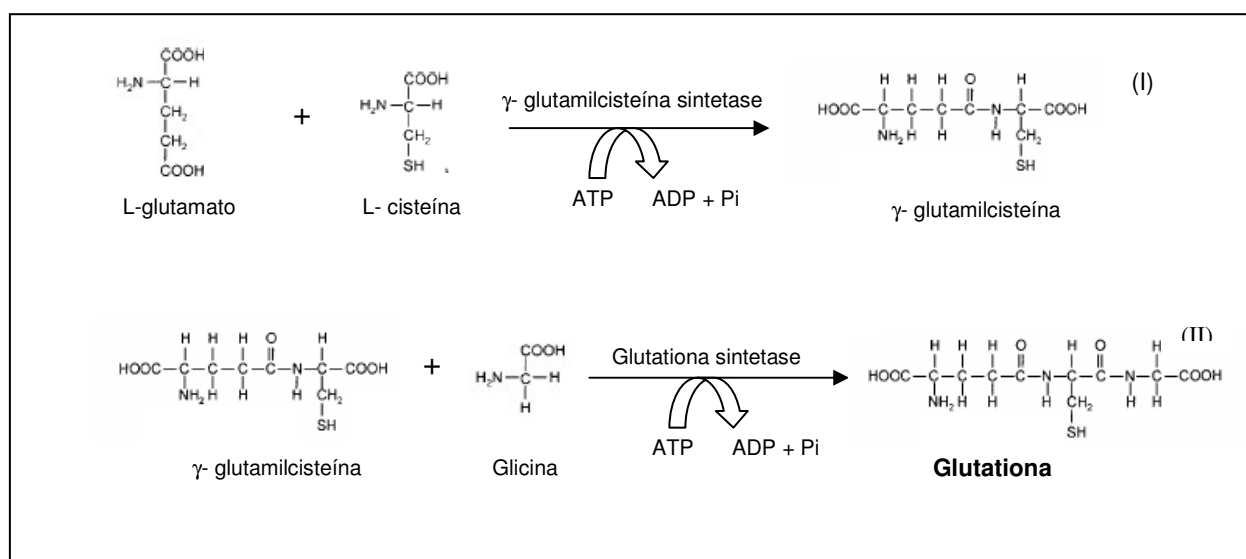


FIG.5: Biossíntese da glutationa

FONTE: Adaptado de NOCTOR et al., 1998.

A glutathiona tem um papel importante na segunda linha de defesa antioxidante, por contribuir com um grande número de processos (CNUBBEN et al., 2000), e o seu papel fisiológico está implicado em várias funções celulares, como: transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção de enzimas na sua forma ativa, regulação do shunt hexose-monofosfato, proteção contra radiação e exposição a endotoxinas e na melhora do choque séptico e cardiogênico (PASTORE et al., 2003).

A glutathiona participa de reações de transhidrogenação que envolvem a formação e manutenção de grupos sulfidril e outras moléculas (coenzima A, várias enzimas e outras proteínas). Esta molécula apresenta papel redutor em muitas reações, tendo uma função importante na detoxificação do H_2O_2 , outros peróxidos e radicais livres. Além disso, participa da detoxificação de uma variedade de xenobióticos, que posteriormente serão excretados pela urina ou fezes na forma de ácido mercaptúrico (PASTORE et al., 2003).

Durante a detoxificação de EROs, a GSH está envolvida em dois tipos de reações: (a) GSH reage com radicais livres como o ânion superóxido, óxido nítrico e radicais hidroxil e (b) GSH atua como um doador de elétrons na redução de peróxidos realizada pela GPx. Em particular, a GSH é consumida na degradação de hidroperóxidos realizada pela GPx, levando à formação da GSSG, que é reconvertida para GSH com consumo de NADPH como doador de elétrons pela glutathiona redutase (FIG.3 e 4) (CAMERA; PICARDO, 2002).

A relação GSH/GSSG é um bom indicador de estresse oxidativo. Em células normais, o conteúdo de glutathiona oxidada é menos de 10% do conteúdo de glutathiona total. Células saudáveis mantêm uma relação elevada GSH/GSSG, assegurando a disponibilidade de GSH para promover a eliminação do H_2O_2 . Por outro lado, quando essa relação apresenta-se diminuída, há indícios de que a formação de EROs é superior à quantidade de GSH disponível e/ou saturação enzimática da glutathiona reduzida (CABRERA et al, 2005).

Dado o papel da glutathiona na proteção contra o estresse oxidativo e detoxificação de xenobióticos, sua disponibilidade na forma reduzida é um fator chave na manutenção da saúde. Estando bem estabelecido que a diminuição da concentração de GSH está associada com o envelhecimento e a patogênese de muitas doenças, incluindo artrite reumatóide, distrofia muscular, esclerose amiotrófica lateral, AIDS, doença de Alzheimer, hepatite

alcoólica, catarata, algumas síndromes respiratórias e Síndrome de Werner (PASTORE et al., 2003).

Assim, alguns estudos têm direcionado o interesse no monitoramento de glutatona em amostras biológicas com o propósito de estudar algumas patologias relacionadas ao estresse oxidativo. Desta forma, o controle do conteúdo de glutatona pode fornecer informações bioquímicas importantes a respeito do balanço oxidante/antioxidante do organismo e, ao mesmo tempo, permitir correlações clínico-laboratoriais com processos mutagênicos, nos quais a quantificação de glutatona como indicador dos níveis de processos de lipoperoxidação é associada com outros exames complementares, como provas de função hepática e renal, exames estes que traçam um perfil bioquímico mais amplo acerca de possíveis patologias relacionadas ao estresse oxidativo (JÚNIOR et al., 2001).

2.2.3. Lipoperoxidação

O estresse oxidativo leva a um aumento da lipoperoxidação (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). As reações de lipoperoxidação são, geralmente, impulsionadas por EROs, sendo que uma única ERO pode induzir a oxidação de um grande número de moléculas de substratos, que são representados por ácidos graxos poli-insaturados. Portanto, um único iniciador pode levar à conversão de um grande número de moléculas de ácidos graxos poli-insaturados em hidroperóxidos lipídicos (ABUJA; ALBERTINI, 2001).

Quando ocorre diminuição do sistema de defesa antioxidante observa-se um aumento na lipoperoxidação no plasma, sendo um dos produtos finais desse processo o malondialdeído (MDA) (DEVASAGAYAM et al., 2004). O MDA é o principal e mais estudado produto de peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Os produtos da peroxidação lipídica são, principalmente, aldeídos com habilidade de exacerbar o dano oxidativo. Sua longevidade e alta reatividade permitem que essas moléculas atuem no interior e exterior de células, interagindo com biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas e ocasionando danos irreversíveis aos delicados mecanismos que envolvem a funcionalidade celular (DEL RIO et al., 2005).

O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (SRAT's), de modo que, sob fortes condições ácidas ou de aquecimento, as amostras biológicas reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) levando à formação de produtos de coloração rosa que podem ser medidos por métodos colorimétricos ou fluorométricos. (LYKESFELDT, 2007).

Muitas hipóteses que descrevem a formação do malondialdeído *in vivo* foram propostas. Uma delas, proposta por Prior e Stanley (1975) e confirmada por Frankel e Neff (1983), sugere que os lipídios oxidados são capazes de produzir MDA como produto de decomposição. O mecanismo envolve a formação de endoperóxidos semelhantes a prostaglandinas com duas ou mais ligações duplas. Um outro mecanismo, proposto por Esterbauer et al. (1991), baseia-se na formação sucessiva de hidroperóxidos e β - clivagem de ácidos graxos poli-insaturados. Neste caso, o malondialdeído é formado pela β - excisão do 3- hidroperoxialdeído ou através da reação entre o radical acroleína com o radical hidroxil. Enquanto a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados é a maior fonte de MDA *in vivo*, outras fontes minoritárias existem, como a geração de bioprodutos de radicais livres pelas radiações ionizantes ou biossíntese de prostaglandinas. (LYKKESFELDT, 2007).

O MDA é um dos mais conhecidos produtos secundários de lipoperoxidação e pode ser usado como um indicador de injúria à membrana celular, proveniente de situações de estresse oxidativo, que estão implicadas na patogênese de várias doenças, incluindo diabetes, câncer, aterosclerose, doença e renal e de Alzheimer (GROTTO et al., 2007).

2.3. ESTRESSE OXIDATIVO NO LES

O DNA é um dos alvos de agentes oxidantes em doenças autoimunes. Dessa forma, o dano oxidativo ao mesmo pode explicar diversas disfunções patogênicas no LES, por exemplo, a influência na produção ou reatividade de auto-anticorpos, aumentando a antigenicidade e a indução na disfunção celular (EVANS et al., 2000). Garg; Ali (1998) e Arfaj et al (2007), relatam que as EROs, geradas por células fagocíticas, penetram através das membranas celulares e reagem com o DNA nuclear, resultando em uma subsequente liberação de anticorpos anti ds-DNA, que contribuem para o desenvolvimento do LES.

As EROs são ativadores fisiológicos de fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como o ativador de proteína 1 (AP-1), $TNF\alpha$, IL8, IL9, IL3, $IFN\gamma$, moléculas de adesão (e-selectina e VCAM-1), antígenos HLA classes I e II, entre outros. A literatura menciona que ocorre um aumento das citocinas pró-inflamatórias com o avanço das doenças reumatológicas, como o LES. Durante a atividade da doença os antígenos HLA de classe I e II estão altamente expressos nos linfócitos ativados. Portanto, podemos supor que o estresse oxidativo pode modificar a atividade inflamatória e, então, induzir um avanço da doença (SUKKAR; ROSSI, 2004).

Como a inflamação crônica está associada ao aumento do estresse oxidativo, muitos estudos têm sido dirigidos para avaliação do status oxidante em pacientes com LES (AVALOS et al., 2007). Diversos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo está aumentado em pacientes com LES (AVALOS et al., 2007; KURIEN et al., 2003; NUTTALL et al., 2003; AMES et al., 1999).

Bergamo et al (2007) constatou em ratos MRL-Ipr, um modelo de rato protótipo para o LES em humanos, pois produzem múltiplos auto-anticorpos, a habilidade do ácido linoléico conjugado, uma substância com propriedades antioxidantes, para modular o estresse oxidativo.

Simard e Costenbarder (2007) relatam que antioxidantes como as vitaminas A, C e E fornecem uma proteção na detoxificação de EROs em pacientes com LES, porém, constatam que, apesar dos mecanismos biológicos plausíveis, pesquisas epidemiológicas têm explorado o papel de fatores nutricionais na etiologia do LES.

Avalos et al (2007) relatam que o estresse oxidativo pode está relacionado a muitas manifestações clínicas no LES, que não são explicados por outros mecanismos. Desta forma, o estudo dos parâmetros de estresse oxidativo (SOD-E.C. 1.1.15.1.1, GPx -E.C. 1.1.1.9, GSH, CAT-E.C. 1.1.1.6 e SRAT's) é importante para promover uma melhor compreensão e esclarecimento do envolvimento desses agentes na patogênese do LES, fornecendo dados científicos que possam auxiliar futuramente a avaliação de formas para evitar a progressão da doença, ou mesmo de terapêuticas antioxidantes que possam minimizar danos ocasionados pelas EROs originadas nessa patologia.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

- Analisar os parâmetros de estresse oxidativo no **LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar se ocorrem alterações nos parâmetros antioxidantes ao se analisar o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e as atividades da superóxido dismutase (SOD- E.C. 1.1.15.1.1), da glutathiona peroxidase (GPx-E.C. 1.11.1.9) e da catalase (CAT-E.C. 1.11.1.6) em pacientes com LES;
- Avaliar se ocorre aumento na lipoperoxidação em portadores de LES, através da determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (SRAT's) no plasma, comparando indivíduos sadios com pacientes portadores de LES.

4. METODOLOGIA

4.1. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, sendo aprovado com o protocolo de número 162/06-CEP-UFRN (ANEXO C). Antes das intervenções, todos os indivíduos foram informados sobre o objetivo do estudo e só participaram aqueles que assinaram o “Termo de Consentimento Consciente” (APÊNDICE A), segundo a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

4.2. CASUÍSTICA

4.2.1 População de estudo

O estudo caracterizado como transversal descritivo foi realizado com dois grupos de indivíduos adultos, do sexo feminino, com faixa etária entre 19 a 50 anos, que foram subdivididos em: grupo controle (constituído de indivíduos saudáveis) e grupo de estudo (constituído pelo grupo de pacientes portadoras de LES sem atividade de doença) (Mex-SLEDAI < 2).

4.2.2. Critérios de inclusão e exclusão no estudo

Através de um questionário (APÊNDICE B), foi selecionado o grupo controle, constituído de indivíduos saudáveis, cujos critérios de inclusão estabelecidos para participarem do estudo foram: indivíduos sem histórico de doença, que não houvessem feito uso de medicamentos e álcool até 72 horas antes das coletas e nem houvessem praticado nenhum tipo de exercício físico nesse mesmo período; não serem tabagistas e não estarem grávidas. Para seleção dos pacientes com LES foi considerada a anamnese e a avaliação clínica de um reumatologista que indicou para o estudo os pacientes segundo os critérios do *American Rheumatism Association* (ANEXO A) e considerou para classificação do Índice de Atividade de Doença no LES o Mex-SLEDAI (ANEXO B), só indicando para o estudo pacientes que apresentaram score menor do que dois, classificadas como sem atividade de doença. Foram excluídos pacientes portadores de

imunodeficiências, atópicos e de outras doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide, amiloidose, dentre outras. Excluíram-se também pacientes gestantes.

4.2.3. Grupo controle

Neste grupo, constituído por 30 indivíduos adultos do sexo feminino, com faixa etária entre 19 a 50 anos, utilizou-se como amostra o sangue obtido por punção venosa, para determinação de parâmetros de estresse oxidativo (SOD- E.C. 1.1.15.1.1, GPx-E.C. 1.11.1.9, GSH, CAT-E.C. 1.11.1.6 e SRAT's), dosagens bioquímicas e dosagem de hemoglobina (Hb).

4.2.4. Grupo de estudo

O grupo de estudo é constituído por 19 pacientes adultas portadoras de LES, com faixa etária entre 19 a 50 anos. Neste grupo também se utilizou como amostra o sangue obtido por punção venosa, para determinação de parâmetros de estresse oxidativo (SOD- E.C. 1.1.15.1.1, GPx-E.C. 1.11.1.9, GSH, CAT-E.C. 1.11.1.6 e SRAT's), dosagens bioquímicas e dosagem de Hb.

4.3. METODOLOGIA

4.3.1 Obtenção do material biológico

Foram coletados 20mL de sangue por punção em veia periférica de ambos os grupos, no período de março de 2007 a julho de 2008, pela manhã, após um período de 12 horas de jejum, conforme recomendação para determinação dos parâmetros do estresse oxidativo (BEUTLER, 1984; DRAPER et al., 1993), das determinações bioquímicas e dosagem de hemoglobina. Posteriormente, as amostras foram distribuídas em tubos com EDTA 5% para determinação dos parâmetros de avaliação do estresse oxidativo e dosagem de Hb e em tubos sem anticoagulante para determinação das análises bioquímicas, e submetidas a procedimentos específicos para cada análise (FIG.6).

4.3.2. Análises laboratoriais

As análises dos parâmetros de avaliação do estresse oxidativo (SOD-E.C. 1.1.15.1.1, GPx-E.C. 1.11.1.9, GSH, CAT-E.C. 1.11.1.6 e SRAT's) foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar (LABMULT). As dosagens de Hb foram feitas no laboratório de Hematologia e as dosagens bioquímicas no Laboratório de Bioquímica, todos localizados na Faculdade de farmácia da UFRN e pertencentes ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. O tempo entre a coleta e o processamento da amostra foi de, no máximo 2h, sendo que as amostras para realização das medidas dos parâmetros de estresse oxidativo foram mantidas a 4°C.

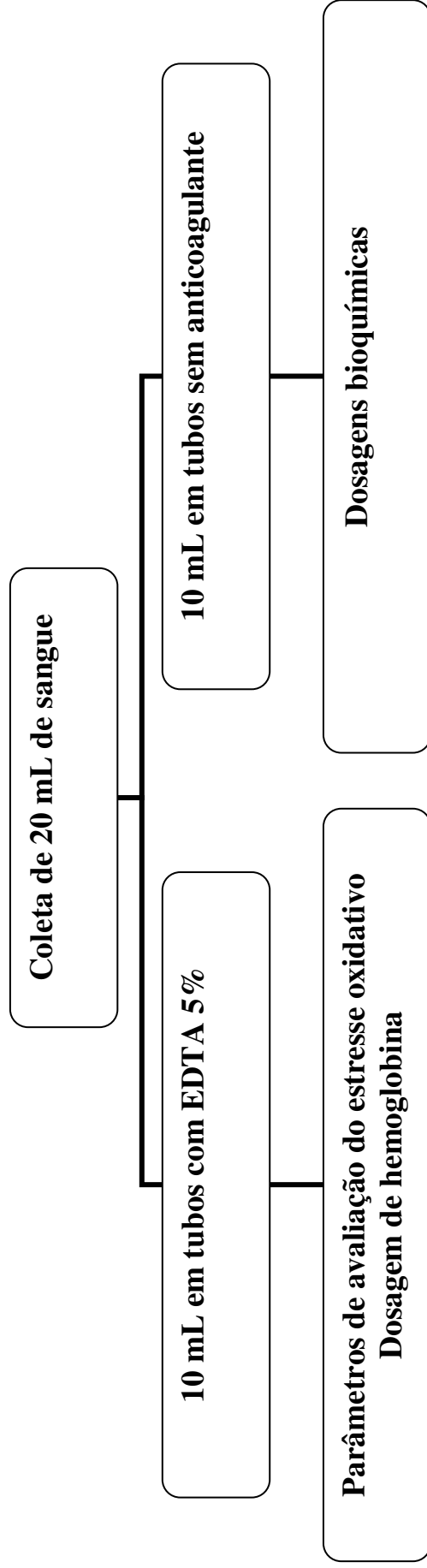


FIG.6: Esquema da metodologia utilizada na coleta

4.3.2.1. Dosagens bioquímicas

Foram distribuídos 10 mL de sangue em dois tubos sem EDTA 5% para a obtenção do soro e realização das dosagens bioquímicas. Essas dosagens foram utilizadas para avaliação do estado de saúde dos indivíduos constituintes do grupo controle, mesmo após a aplicação do questionário e consideração dos critérios de inclusão e exclusão. Desta forma, foram avaliados: a glicemia, o perfil renal (através da dosagem de ureia e creatinina). O perfil lipídico foi obtido por meio das dosagens dos triglicerídeos, colesterol total e frações e o perfil hepático avaliado por meio da dosagem das enzimas hepáticas (fosfatase alcalina, transaminase glutâmica pirúvica, transaminase glutâmica oxalacética e gama glutamil-transferase), além das proteínas totais e albumina.

As dosagens bioquímicas foram realizadas utilizando-se kits e as leituras feitas em aparelho semi-automatizado (RA-Bayer). As dosagens de creatinina sérica, glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações, gama glutamil transferase, proteínas totais e albumina foram realizadas utilizando-se kits da LABTEST, e as dosagens de ureia e enzimas hepáticas, com exceção da gama glutamil transferase, foram realizadas utilizando-se kits da LABORLAB (FIG.7).

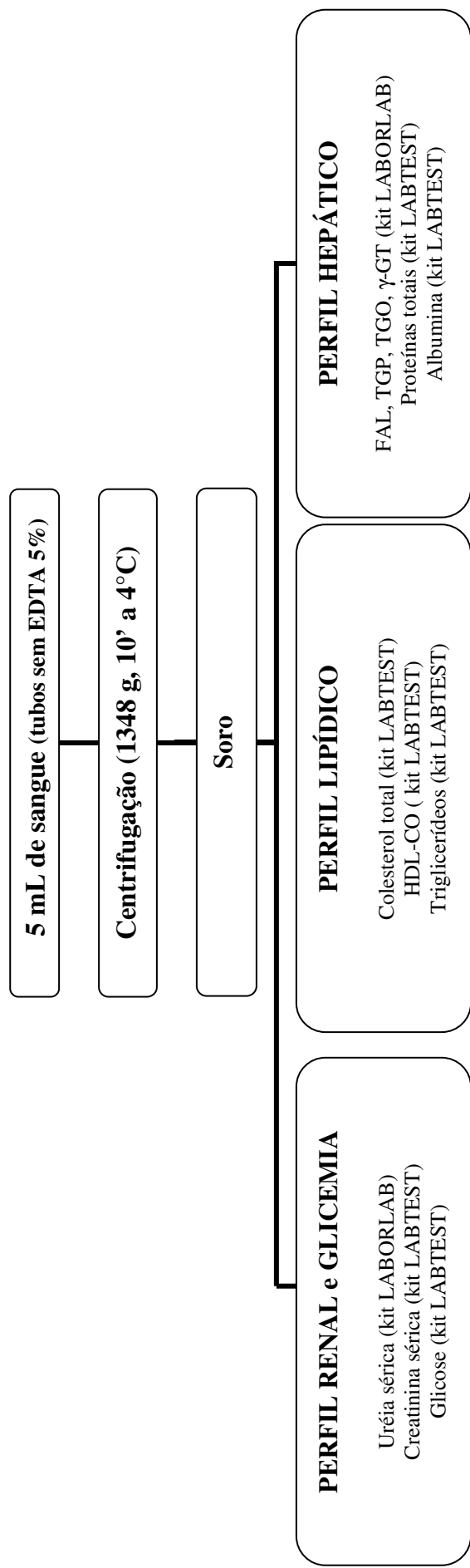


FIG.7: Esquema da metodologia utilizada nas análises bioquímicas

4.3.2.2. Análise dos parâmetros de estresse oxidativo

4.3.2.2.1. Procedimento prévio

A amostra de 10 mL de sangue distribuída no tubo com EDTA 5% foi utilizada para dosagem de hemoglobina e avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo (SOD- **E.C. 1.1.15.1.1**, GPx-**E.C. 1.11.1.9**, GSH, CAT-**E.C. 1.11.1.6**, SRAT's). Para esta finalidade foi retirada uma alíquota (20µL) do sangue total para dosagem de Hb e outra (200µL) para determinação do conteúdo de glutatona reduzida. Posteriormente, para separação do plasma e eritrócitos, a amostra foi centrifugada a 1348 g por 10 minutos a 4°C. O plasma obtido foi utilizado na determinação da concentração de SRAT's; uma alíquota dos eritrócitos foi utilizada para se obter um hemolisado, a partir do qual foi feita a determinação da atividade da CAT (**E.C. 1.11.1.6** - CAT), e outra alíquota foi colocada em um eppendorf e refrigerada a -80°C para posterior determinação das atividades da SOD (**E.C. 1.1.15.1.1** - SOD) e da GPx (**E.C. 1.11.1.9** - GPx) (FIG.9).

4.3.2.2.2. Determinação da glutatona reduzida

A glutatona reage com o ácido 5,5'- ditio-bis-(2- nitrobenzóico) (DTNB), formando um tiolato (TNB) de cor amarelada, mensurável em 412 nm (BEUTLER et al., 1963) (FIG.8). O seu teor foi determinado em meio de reação contendo tampão fosfato/NaCl 0,2M pH 8,0 e DTNB (2,525 mM).

Para a determinação do conteúdo de GSH retiraram-se 200µL, a partir dos 10mL de sangue total coletado com EDTA 5% e pipetou-se em 800µL de ácido tricloroacético (TCA) 12%. Levou-se à centrífuga por 5 minutos, a 1348 g, a 4°C. Colocaram-se 200µL do sobrenadante em 2,0mL de tampão fosfato/NaCl 0,2M pH 8,0. No momento da leitura espectrofotométrica, adicionaram-se 200µL de DTNB e mediu-se a absorbância a 412nm.

O branco foi preparado nas mesmas condições da amostra substituindo o sangue total por 200µL de água destilada, retirando-se 100µL e adicionando-se a 1,9 mL de tampão fosfato/NaCl 0,2M pH 8,0. A análise foi realizada em duplicata.

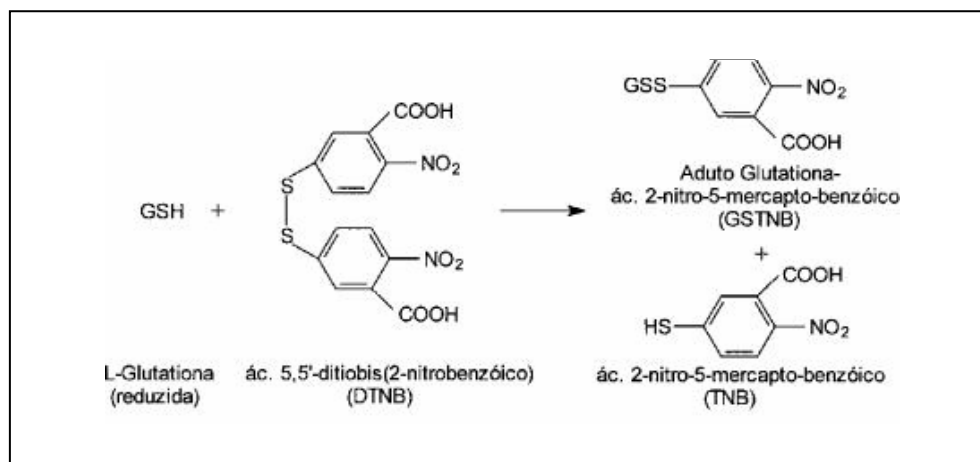


FIG.8: Reação entre a GSH e o 5,5'- ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB)

FONTE: JÚNIOR et al., 2001.

O cálculo para determinação da glutathiona reduzida foi o seguinte:

$$\text{Mmol GSH}^{-1} \text{ (mM)} = \frac{A_{412} \times \text{Fator de diluição}}{14,1}$$

14,1

Onde:

A_{412} = Absorbância a 412nm;

Fator de diluição = 60,5

ϵ = 14,1 (Coeficiente de extinção molar em pH 8,0 do ânion tiolato).

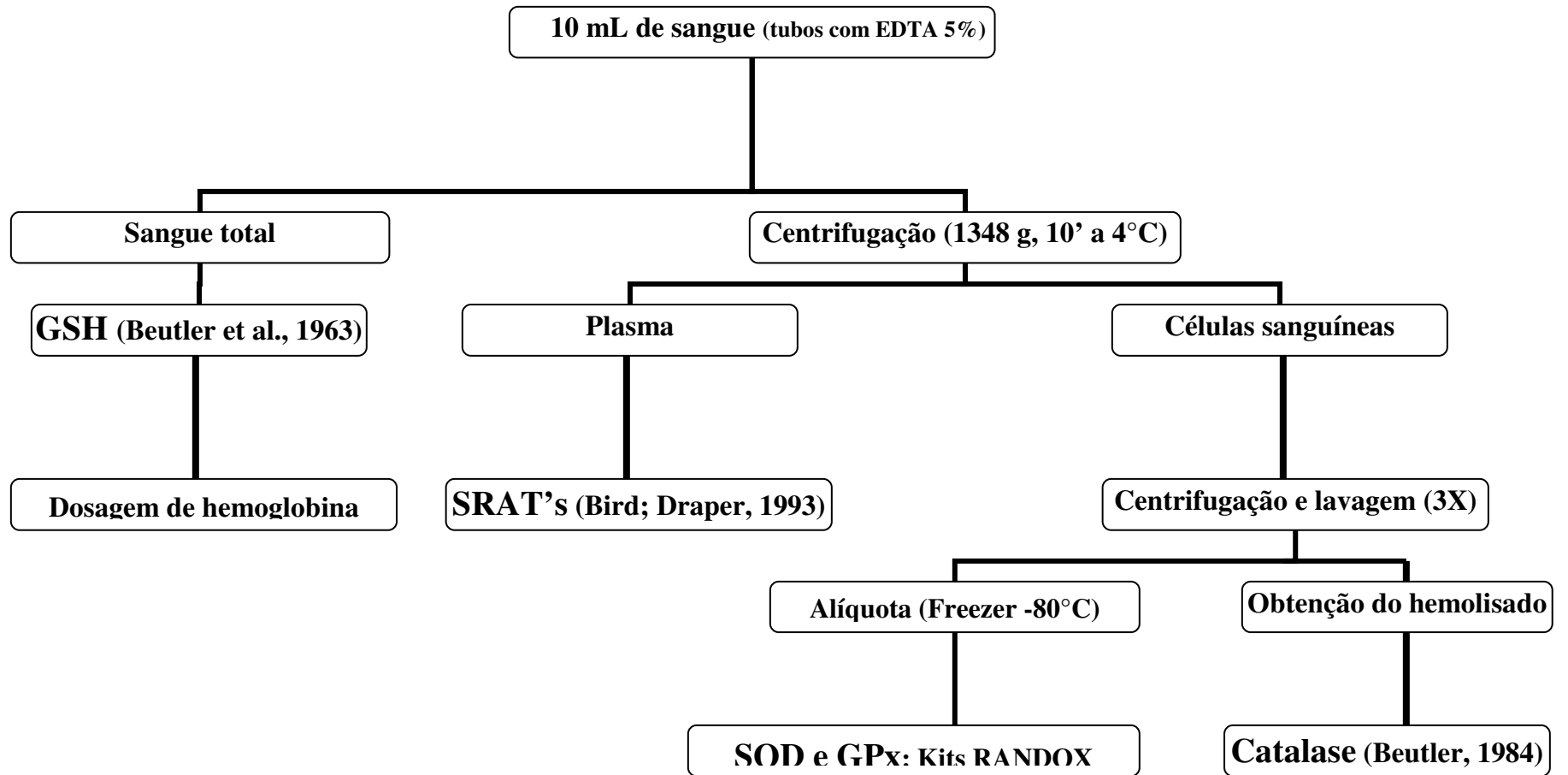
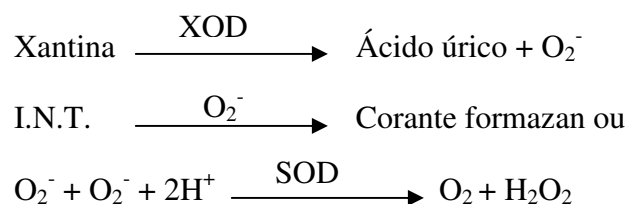


FIG.9: Esquema da metodologia utilizada nas análises laboratoriais dos parâmetros de estresse oxidativo

4.3.2.2.3. Determinação da atividade da superóxido dismutase (E.C. 1.1.15.1.1 - SOD)

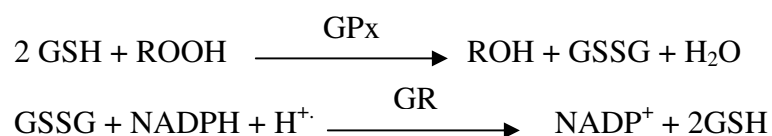
A determinação da atividade da SOD (E.C. 1.1.15.1.1 - SOD) no eritrócito foi realizada através do kit RANSOD SD-125 da Randox laboratories Ltda. O princípio do kit baseou-se no papel da SOD (E.C. 1.1.15.1.1 - SOD) em acelerar a dismutação do radical tóxico superóxido, produzido durante o processo oxidativo em H_2O_2 e O_2^- . O método empregou xantina e xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido, os quais reagiram com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (I. N.T) para formar o composto vermelho formazan. Desta forma, a atividade da SOD foi medida através do grau de inibição dessa reação:



As amostras foram lidas em espectrofotômetro Shimadzu UV mod. 1650 PC, Shimadzu Inc em absorvância de 505 nm.

4.3.2.2.4. Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (E.C. 1.11.1.9 – GPx)

A determinação da atividade da GPx (E.C. 1.11.1.9 – GPx) no eritrócito foi realizada através do kit RANSEL RS-504 da Randox laboratories Ltda. O princípio utilizado pelo kit baseou-se no método de Paglia e Valentine, em que a GPx (E.C. 1.11.1.9 – GPx) catalisa a oxidação da GSH pelo hidroperóxido de cumeno. Na presença da glutathiona redutase e NADPH, a glutathiona oxidada (GSSG) é imediatamente convertida para a forma reduzida, com a simultânea oxidação do NADPH para NADP^+ . Desta forma, a atividade da GPx (E.C. 1.11.1.9 – GPx) foi medida indiretamente pela diminuição da concentração de GSSG e NADPH através da reação:



As amostras foram lidas no espectrofotômetro Shimadzu UV mod. 1650 PC, Shimadzu Inc em absorvância de 340 nm.

4.3.2.2.5. Determinação da atividade da catalase (E.C. 1.11.1.6 - CAT)

O procedimento determina a velocidade de decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio, catalisada pela enzima catalase (E.C. 1.11.1.6 - CAT) através do decréscimo de absorvância a 230nm a 25°C. O meio de reação utilizado contém tampão tris HCl-EDTA (5mM), pH 8,0 (BEUTLER, 1984).

Inicialmente, foi realizada a centrifugação do sangue total coletado com EDTA 5% a 1348 g, por 10 minutos a 4°C, para a separação dos eritrócitos e demais constituintes. O plasma foi utilizado para a determinação das SRAT's. Em seguida, foram realizadas três lavagens sucessivas dos eritrócitos com solução tampão fosfato/NaCl 0,2M pH 7,4, centrifugando-os a 1348 g, por 15 minutos a 4°C. Transferiram-se 200µL dos eritrócitos lavados para um tubo cônico contendo 1,8mL de solução hemolisante de β- mercaptoetanol em EDTA. O hemolisado obtido foi submetido a três etapas de congelamento (freezer) e descongelamento (banho-maria a 37°C). Então, o hemolisado foi centrifugado a 11.050 g por 40 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da atividade da catalase (E.C. 1.11.1.6 - CAT). Em seguida, colocaram-se 10µL do sobrenadante em 1,99 mL de solução hemolisante de β- mercaptoetanol, retiraram-se 20µL dessa solução, colocando-os em cubeta contendo 980µL de um meio de reação constituído por tampão tris HCl-EDTA (5mM), pH 8,0 e peróxido de hidrogênio a 50% (H_2O_2 10mM), preparado previamente. Na preparação do branco utilizou-se um pool do sobrenadante das amostras, retirando-se 20µL desse pool e colocando-os na cubeta contendo 980µL de um meio de reação constituído por tampão tris HCl-EDTA (5mM), pH 8,0.

Em seguida, As amostras foram lidas em espectrofotômetro Shimadzu UV mod. 1650 PC, Shimadzu Inc em absorvância de 230nm. O cálculo para a determinação da atividade da catalase (E.C. 1.11.1.6 - CAT) foi feito conforme a seguinte equação:

$$\text{CAT (U/mg de Hb)} = \frac{\Delta A_{230} \times \text{Diluições}}{39,5 \times \text{TE} \times \text{Hb}}$$

onde:

ΔA_{230} = Variação da absorvância a 230nm por minuto

Diluição = $2,4 \times 10^6$

$\epsilon = 39,5$ (Coeficiente de extinção molar)

TE = tomada de ensaio

Hb = Concentração de hemoglobina do indivíduo em g/dL

4.3.2.2.6. Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

O procedimento utilizado para determinação das SRAT's baseia-se na reação do MDA, formando um complexo cor-de-rosa que é produzido durante a quebra de lipídios peroxidados (FIG.10). A absorvância foi medida em espectrofotômetro Shimadzu UV mod. 1650 PC, Shimadzu Inc a 535 nm (BIRD; DRAPER, 1984).

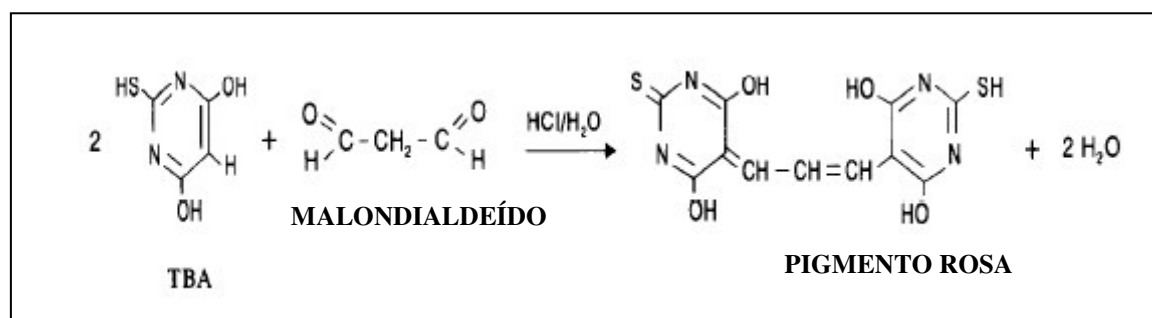


FIG.10: Reação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA)

FONTE: Adaptado de FERNÁNDEZ, J; PEREZ- ÁLVAREZ, J.A; FERNÁNDEZ- LÓPEZ, J.A, 1996

Para essa determinação foi utilizado o plasma obtido após centrifugação a 1348 g, por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, 300µL do plasma foram colocados em um eppendorff de 2mL, acrescentando-se 600µL de ácido tricloroacético (TCA) a 30%. A mistura foi agitada por 1 minuto e adicionaram-se 600µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,73%, agitando-se, em seguida, por mais 1 minuto. A mistura foi aquecida em banho-

maria a 100°C durante 1 hora, sendo colocada em banho de gelo por 20 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 2500g por 20 minutos a 4°C. Logo após, o sobrenadante foi separado em um tubo de ensaio para leitura em absorvância de 535 nm. A análise foi realizada em duplicata.

Para obtenção do branco, foi utilizado o mesmo procedimento realizado com a amostra, substituindo os 300µL de plasma por água destilada.

O cálculo para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi feito com base na seguinte equação:

$$[\text{SRAT's}] = \frac{A_{535\text{nm}} \times \text{diluição}}{\epsilon}$$

onde:

Diluição = 5

A₅₃₅ = absorvância a 535nm

ε = coeficiente de extinção molar = 0,156 (535nm)

4.3.2.3. Dosagem de hemoglobina

A dosagem de hemoglobina foi realizada através do método da cianometahemoglobina, utilizando como reagente a solução diluidora de Drabkin com a finalidade de utilizar o seu resultado no cálculo para determinação da atividade da catalase (**E.C. 1.11.1.6** - CAT). O princípio deste método baseia-se na reação da hemoglobina com o cianeto de potássio e o ferricianeto de potássio, presentes na solução de Drabkin, formando a cianometahemoglobina, que será determinada espectrofotometricamente a 540nm (DACIE; LEWIS, 1995). Foi utilizado o padrão de hemoglobina da Labtest®, e as leituras foram realizadas no espectrofotômetro COLEMAN- 395UV. Os valores de referência considerados normais, segundo a Organização Mundial de Saúde (1973), são de >12g/dL (mulheres) e > 13g/dL (homens).

O cálculo para determinação do resultado da hemoglobina foi feito conforme a equação:

$$\mathbf{Hb = Fc \times Abs_{540}}$$

Onde:

Hb = Concentração de hemoglobina

Fc = Fator de calibração

Abs₅₄₀ = Absorbância da amostra a 540nm

O cálculo para o fator de calibração é obtido dividindo-se a concentração do padrão pela absorbância do padrão.

Foi realizada ainda a dosagem da hemoglobina eritrocitária para o cálculo da atividade da SOD (**E.C. 1.1.15.1.1** - SOD) e da GPx (**E.C. 1.11.1.9** - GPx). Inicialmente, foi realizada uma diluição de 1:4 dos eritrócitos em água destilada. Em seguida, 20µL da amostra diluída foram acrescentados a 5 mL da solução diluidora de drabkin sendo que o procedimento realizado, bem como o cálculo da concentração de hemoglobina seguiram a mesma metodologia citada acima. O cálculo do valor final foi corrigido, multiplicando-se o valor obtido por 4. As análises foram realizadas em duplicata.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD). A análise estatística foi realizada usando o programa Graph pad instat (versão software 3.03) e microsoft Excel versão 2003. Para a análise comparativa dos grupos, foi utilizado o teste t-student, considerando um nível de significância (P<0,05).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A patogênese do LES é multifatorial, com influências endógenas e exógenas. A inflamação, durante os períodos de exacerbação, sugere que o estresse oxidativo está presente nesta patologia. Esse pode ser um fator importante na disfunção das células do sistema imune, produção de auto-antígenos e reatividade dos auto-anticorpos (EVANS et al., 2000).

O presente estudo incluiu 19 pacientes com LES sem atividade de doença (Mex-SLEDAI < 2), referente ao grupo de estudo, sendo todas mulheres com média de idade de 32 ± 11 anos, atendidas no ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário Onofre Lopes, Natal, RN, que é o único centro de referência no atendimento de adultos com essa doença no Estado. As pacientes com LES apresentaram tempo de doença em torno de 5 ± 3 anos. Foram selecionadas, como controle, 30 mulheres saudáveis, com média de idade de 35 ± 10 anos (TABELA 1).

Os dados mostraram o predomínio de LES no sexo feminino, estando de acordo com a literatura clássica e com estudo realizado por Bezerra et al (2005), o qual relata que, em serviço de referência grande parte das pacientes são encaminhadas de outros locais. Assim, casos de LES em homens talvez não estejam sendo reconhecidos pelos serviços não-especializados. De acordo com Simard e Costenbader (2007), a predominância do LES no sexo feminino deve-se à influência dos hormônios sexuais na patogênese dessa doença.

TABELA 1: Dados demográficos das pacientes com LES e grupo controle

Variáveis	*LES (n= 19)	Controle (n=30)	P
Idade (anos)	32 ± 11	35 ± 10	NS
Fumo	Não	Não	NS
Tempo de doença (anos)	5 ± 3	—	
Score Mex-SLEDAI	< 2	—	
Medicamentos usados		—	
- Prednisona (%)	74	—	
- Antimaláricos (%)	21	—	

* Pacientes com LES sem atividade da doença (grupo de estudo).

TABELA 2: Perfil bioquímico das pacientes com LES e grupo controle

Variáveis	*LES (n= 19)	Controle (n=30)	VR
Glicose (mg/dL)	72,2 ± 8,9	80,1 ± 7,3	70 - 99
Colesterol total (mg/dL)	178,3 ± 32	184,9 ± 36,8	<200
LDL-CO (mg/dL)	101,0 ± 24,9	99,5 ± 29,5	<100
HDL-CO (mg/dL)	52,4 ± 15	60,3 ± 21,3	>60
Triglicerídeos (mg/dL)	124,7 ± 64,6	141,1 ± 139,9	<150
Uréia (mg/dL)	26,8 ± 8,6	25,8 ± 5,7	15 - 40
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,4-1,4
TGP/ALT (U/L)	17,5 ± 7,9	19,1 ± 8,4	Mulher: 10 - 37
TGO/AST (U/L)	22,1 ± 3,2	24,7 ± 4,4	Mulher: 10 - 37
Proteínas totais (g/dL)	6,9 ± 0,4	6,8 ± 0,4	6,0 - 8,0
Albumina (g/dL)	4,0 ± 0,3	3,9 ± 0,4	3,5 - 5,5
Globulina (g/dL)	2,9 ± 0,6	2,9 ± 0,5	---

Em relação ao perfil bioquímico foi verificado que a concentração do LDL-CO estava elevada nas pacientes com LES em relação aos valores de referência (VR < 100 mg/dL) e a concentração do HDL-CO estava diminuída (VR > 60 mg/dL). Todos os demais parâmetros bioquímicos nas pacientes se apresentaram dentro dos índices de normalidade. Alves et al (2003) e Nuttall et al (2003) verificaram o aumento de LDL-CO e triglicerídeos em pacientes com LES, e constataram que esse fato deve-se ao uso crônico de corticóides, o que também pode está relacionado ao risco de desenvolvimento de aterosclerose.

O presente estudo aborda o estresse oxidativo em pacientes com LES, a partir do status antioxidante, avaliado por meio de quatro antioxidantes, sendo um deles um antioxidante não-enzimático, a glutatona reduzida (GSH), e três antioxidantes enzimáticos, representados pela superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase.

Não houve aumento significativo ($P>0,05$) na atividade da SOD ao comparar pacientes com LES ($1658,3 \pm 728,3$ U/ g. Hb) sem atividade de doença com indivíduos saudáveis ($1524,9 \pm 442,0$ U/ g. Hb) (FIG.12). De uma maneira geral, os dados do estudo

realizado estão de acordo com Avalos et al (2007), que relatam que o estresse oxidativo só é aumentado em pacientes com doença ativa, e particularmente, com doença renal e aqueles com anticorpos anti-fosfolípidos, não havendo aumento em pacientes sem doença ativa, situação apresentada por todas as pacientes incluídas nesse estudo.

Considerando-se a definição de hormesis, proposta por Matsson (2008), como uma resposta adaptativa das células e organismos a uma moderada e intermitente situação de estresse, o aumento da atividade da SOD em pacientes com LES provavelmente só ocorreria em pacientes com presença de processo inflamatório em exacerbação, ou seja, com atividade de doença ($\text{Mex-SLEDAI} \geq 2$), estando relacionada com uma adaptação do organismo à situação de estresse oxidativo presente nesse período da doença, no qual o excesso de oxidantes produzido pelas células fagocíticas, levaria à estimulação do sistema antioxidante. Mattson (2008) relata que muitas categorias de proteínas de resistência estão presentes nas respostas horméticas, entre elas as proteínas antioxidantes (SOD e a GPx). Segundo Radak et al (2008), o mecanismo adaptativo é iniciado por fatores de transcrição, resultando em aumento da atividade de enzimas antioxidantes, e mais efetivamente, pelas enzimas de reparo ao DNA e ao complexo proteossoma. A adaptação molecular poderia levar à melhora da função fisiológica e aumento da resistência ao estresse oxidativo. Estudos complementares com pacientes com LES em atividade de doença poderão ser realizados posteriormente, a fim de fornecer subsídios para confirmar os dados acima.

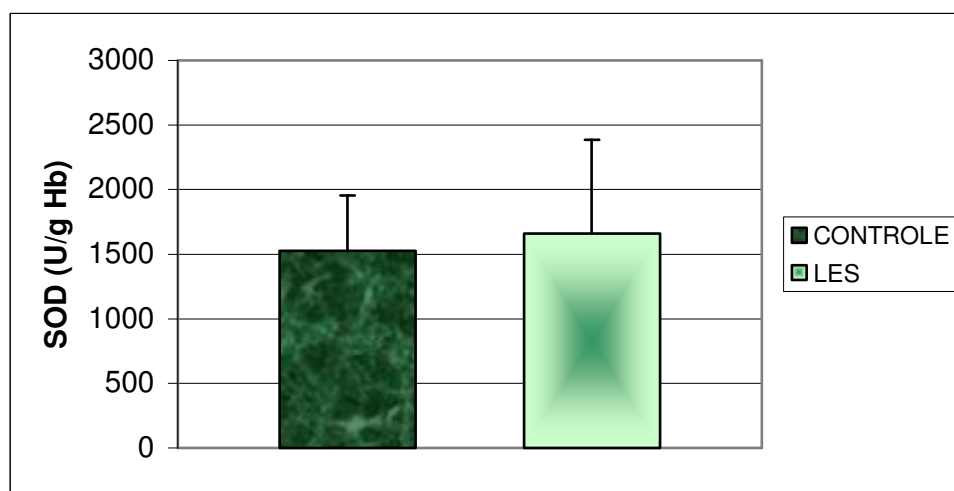


FIG. 11: Resultados da determinação da atividade da SOD nos eritrócitos dos indivíduos participantes do estudo. Os resultados são expressos em média \pm SD, considerando o valor de * $P < 0,05$, grupo controle ($n = 30$) e grupo de estudo ($n = 19$).

Apesar de haver um ligeiro aumento de atividade da GPx nas pacientes com LES ($46,7 \pm 16,3$ U/g. Hb) em relação ao controle ($43,5 \pm 12,7$ U/g. Hb), não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) (FIG.13). Isso pode ser explicado pelo fato de que essas pacientes não apresentam atividade de doença, da mesma forma como ocorreu em relação à atividade da SOD.

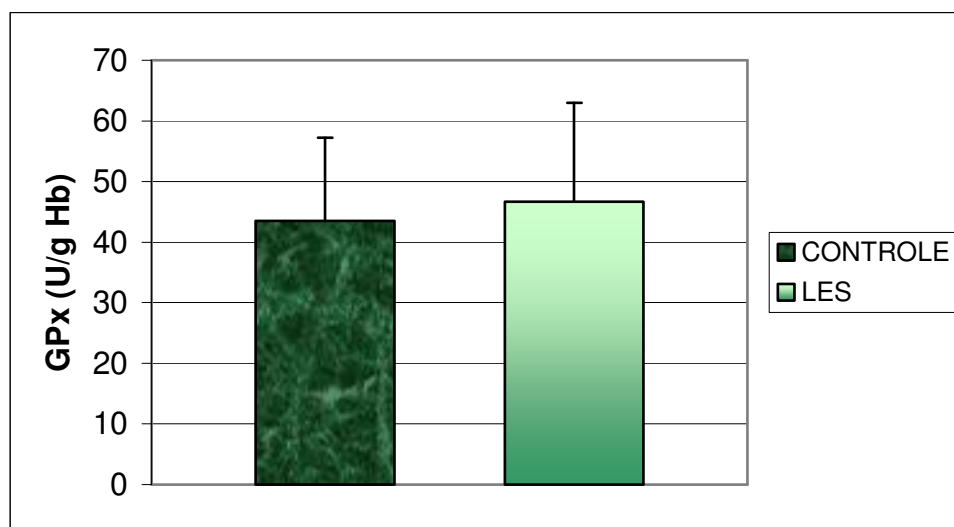


FIG. 12: Resultados da determinação da atividade da GPx nos eritrócitos dos indivíduos participantes do estudo. Os resultados são expressos em média \pm SD, considerando o valor de * $P < 0,05$, grupo controle ($n = 30$) e grupo de estudo ($n = 19$).

Também não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) em relação aos valores do conteúdo de GSH ao comparar pacientes com LES ($385,9 \pm 110,9$ $\mu\text{mol/L}$) a indivíduos saudáveis ($353,0 \pm 91,2$ $\mu\text{mol/L}$) (FIG.14). Este resultado está de acordo com Tewthanow et al (2008), que encontraram resultado semelhante ao avaliar o conteúdo de GSH em pacientes com LES com doença leve, comparando-os a um grupo de indivíduos saudáveis. No mesmo estudo, Tewthanow et al (2008) observaram diferença significativa entre um grupo de pacientes com LES com doença moderada e severa ao comparar com indivíduos saudáveis.

O resultado do conteúdo de GSH no estudo realizado é compatível com a ausência de atividade da doença nos pacientes com LES, que não leva à necessidade do consumo excessivo de GSH.

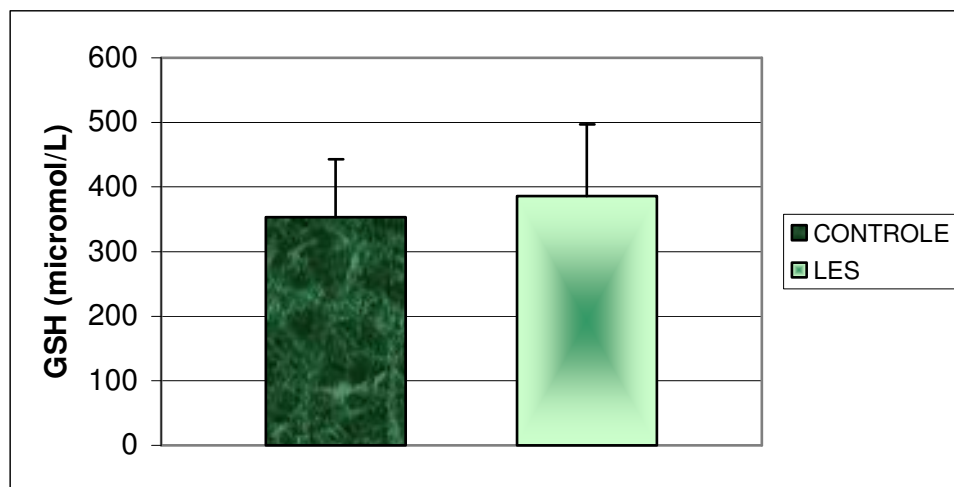


FIG. 13: Resultados do conteúdo de GSH no sangue total dos indivíduos participantes do estudo. Os resultados são expressos em média \pm SD, considerando o valor de $P < 0,05$, grupo controle ($n = 30$) e grupo de estudo ($n = 19$).

Houve uma diminuição significativa ($P^* < 0,05$) na atividade da catalase ao comparar as pacientes com LES ($288,9 \pm 114,6$ U/mg. Hb) ao grupo controle ($375,8 \pm 85,2$ U/mg. Hb) (FIG.15). Este resultado está de acordo com estudos realizados por Bae et al (2002) e Turgay et al (2007), que verificaram que alguns antioxidantes, tais como a catalase, podem ter sua atividade prejudicada no LES. Porém, nem toda a defesa antioxidante é totalmente prejudicada, o que foi verificado em nosso estudo pela manutenção da atividade da SOD e GPx ao comparar pacientes com LES a indivíduos saudáveis.

D'Souza et al (2008) verificaram o perfil eletroforético discrepante da catalase, que migra por volta de 80 kD em pacientes com LES. Eles atribuíram essa anormalidade da migração eletroforética, à modificação oxidativa da catalase pelo hidróxi-2-nonenal, um produto de lipoperoxidação, explicando que a modificação oxidativa da catalase pode ser uma das razões para a mais baixa atividade dessa enzima em pacientes com LES, favorecendo o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Desta forma, a diminuição da atividade da catalase pode afetar o balanço redox nesses pacientes. Porém, não foi avaliada, em nosso estudo, a capacidade antioxidante total, não sendo possível, portanto, o fornecimento de dados conclusivos em relação a esse parâmetro nas pacientes estudadas.

Alguns autores, tais como, Mansour et al (2008), justificam a ação prejudicada de enzimas antioxidantes (SOD e CAT) no LES, pela inibição por auto-anticorpos (anti-SOD, anti-CAT). Sarban et al. (2005) sugerem que, em algumas patologias, como a artrite reumatóide e osteoartrite pode haver a inativação enzimática da catalase por H_2O_2 e sugerem que esta enzima pode desempenhar um papel importante no processo reumático. Estudos complementares seriam necessários para verificar se essa situação também pode ocorrer em pacientes com LES.

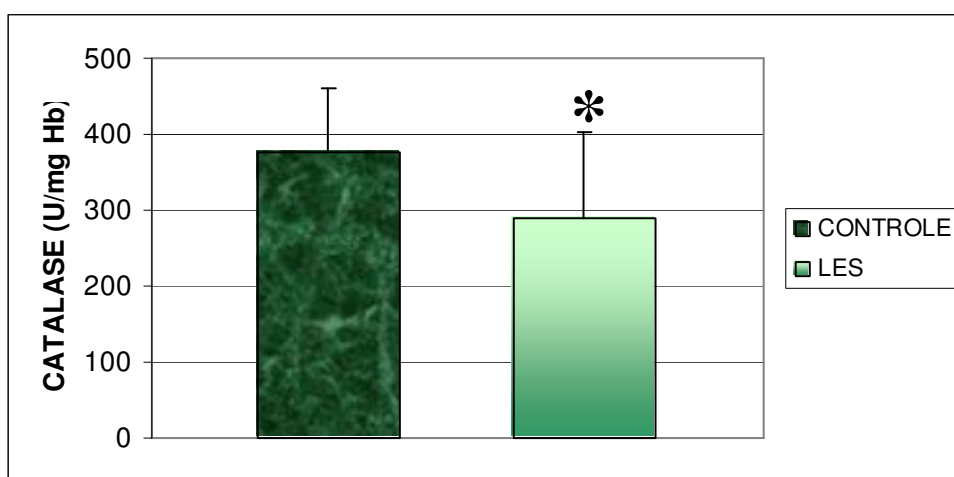


FIG. 14: Resultados da determinação da atividade da CAT nos eritrócitos dos indivíduos participantes do estudo. Os resultados são expressos em média \pm SD, considerando o valor de * $P < 0,05$, grupo controle ($n = 30$) e grupo de estudo ($n = 19$)

Em casos de estresse oxidativo, as EROs são produzidas em quantidade excessiva. Neste caso, para contrabalançar o excesso de oxidantes, o organismo produz antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos como defesa. Porém, quando ocorre o desequilíbrio entre produção e eliminação das EROs pode haver dano tecidual, ocasionado pelos produtos de lipoperoxidação originados (TURGAY et al., 2007; D'SOUZA et al., 2008).

O presente estudo teve como objetivo específico verificar se ocorreu aumento da peroxidação lipídica em pacientes com LES, através da determinação das SRAT's que têm como um dos seus principais produtos, o malondialdeído (MDA). O resultado mostrou um aumento significativo (* $P < 0,05$) da concentração de SRAT's nos pacientes com LES ($5,1 \pm 1 \mu\text{mol/ L}$) em relação ao controle ($3,9 \pm 0,6 \mu\text{mol/ L}$) (FIG.16). Este resultado concorda

com os estudos realizados por Bae et al. (2002) e Nuttall et al. (2003), que verificaram um aumento significativo de MDA e de hidroperóxidos lipídicos, respectivamente, ao comparar pacientes com LES sem atividade de doença a um grupo controle, indicando que houve um aumento na lipoperoxidação nos pacientes com LES, o que sugere uma possível situação de estresse oxidativo nos mesmos. Além disso, Turgay et al (2007) citam que os corticosteróides usados pelos pacientes têm atividade antioxidante, podendo levar à diminuição da concentração de SRAT's nos pacientes com LES. O grupo de pacientes estudado também utilizava prednisona, um corticosteróide podendo, por esse motivo, ter a concentração de SRAT's não tão elevada, porém significativamente estatística em relação ao controle.

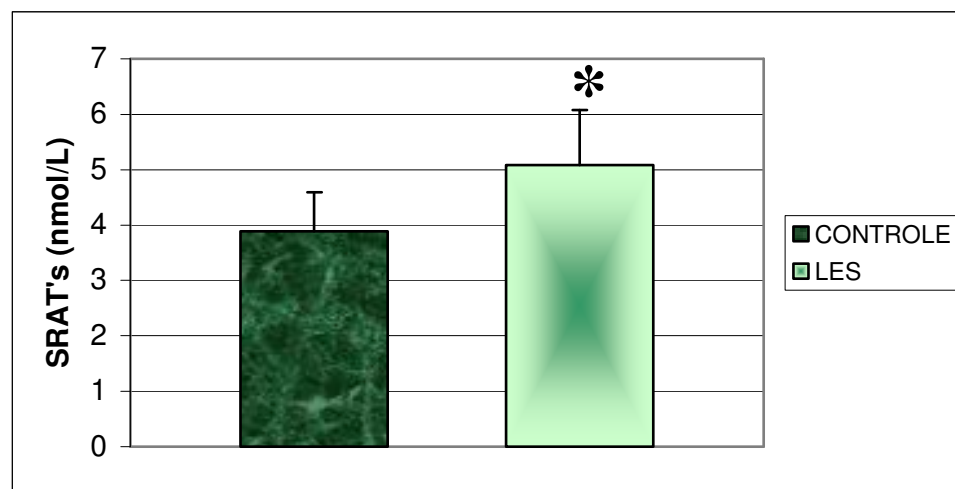


FIG. 15: Resultados da concentração de SRAT's no plasma dos indivíduos participantes do estudo. Os resultados são expressos em média \pm SD, considerando o valor de $P < 0,05$, grupo controle ($n = 30$) e grupo de estudo ($n = 19$).

É possível que, os resultados conflitantes nos estudos relacionados à presença de estresse oxidativo no LES, sejam provenientes da utilização de metodologias diferentes, além de pacientes com características distintas. O estudo realizado apresenta muitas limitações, como o número de indivíduos pequeno para fornecer conclusões definitivas. Apesar disso, o presente estudo tem uma grande importância, fornecendo um dado adicional à literatura, compatível com outros estudos, que demonstram que a presença de estresse oxidativo deve ter um papel na patogênese do LES. Futuramente, um melhor entendimento

entre o envolvimento de oxidantes e a suplementação antioxidante, pode levar a novos métodos terapêuticos em pacientes com LES. Além disso, os parâmetros de monitorização do estresse oxidativo observados neste estudo podem ser utilizadas para auxiliar o diagnóstico de pacientes com LES nas diferentes fases de atividade da doença.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Houve aumento significativo ($*P < 0,05$) na lipoperoxidação ao comparar os pacientes com LES com os indivíduos pertencentes ao grupo controle, o que sugere uma situação de estresse oxidativo nessas pacientes;
- ✓ Não foram verificadas alterações entre os indivíduos do grupo controle e os pacientes com LES em relação ao conteúdo de glutatona reduzida;
- ✓ Não foi verificada um aumento significativo ($P > 0,05$) da atividade da SOD e da GPx ao comparar as pacientes com LES ao controle, provavelmente devido a ausência de atividade de doença nas pacientes incluídas no estudo (Mex-SLEDAI < 2);
- ✓ Houve uma diminuição estatisticamente significativa ($*P < 0,05$) ao comparar a atividade da catalase (CAT) entre os pacientes com LES e o grupo de indivíduos saudáveis. A menor atividade da catalase apresentada pelas pacientes com LES pode ser proveniente do dano oxidativo sofrido por essa enzima;
- ✓ Os resultados do estudo sugerem que o estresse oxidativo pode ter um papel na patogênese da doença no LES, mesmo em pacientes que não estão na fase de exacerbação da doença, ou seja, sem atividade de doença, situação demonstrada pelo aumento da peroxidação lipídica e pela diminuição da atividade da catalase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJA, P.M.; ALBERTINI, R. Methodos for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, [S.I.], v. 306, p.1-17, jan, 2001.

ALVES, J.D et al. Anthiphospholipid antibodies are associated with enhanced oxidative stress, decreased plasma nitric oxide and paraoxonase activity in experimental mouse model. **Rheumatology**, [S.I.], v. 44, p. 1238-1244, jun, 2005.

AMES, P.R et al. Oxidative stress in Systemis Lupus Erythematosus and allied conditions with vascular involvement. **Rheumatology**, Oxford, v.38, p.529-534, 1999.

ARFAJ, A.S.A et al. Immunogenicity of singlet oxygen modified human DNA: implications for anti-DNA antibodies in Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical Immunology**, [S.I.], v.124, p.83-89, 2007.

AVALOS, I et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. **Lupus**, [S.I.], v. 16, p. 195-200, 2007.

BADSHA, H.; EDWARDS, C.J. Intravenous pulses of methylprednisolone for Systemis Lupus Erythematosus. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.32, n.6, p. 370-377, 2003.

BAE, S.C.; KIM, S.J.; SUNG, M.K. Impaired antioxidant status and decreased dietary intake of antioxidants in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology International**, [S.I.], v. 22, p.238-243, set, 2002.

BAVE, U et al. Fc γ RIIa is expressed on natural IFN- α -producing cells (plasmocytoid dendritic cells) and is required for the IFN- α production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. **Journal of Immunology**, [S.I.], v. 171, p. 3296-3302, jul. 2003.

BERGAMO, P.; MAURANO, F.; ROSSI, M. Phase 2 induction by conjugated linoleic acid improves lupus-associated oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.I.], v.43, p.71-79, 2007.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 3 ed. Orlando: Grune & Stratton, 1984, 188p.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.**, [S.I.], v. 61, p. 882-890, 1963.

BORCHERS, A. T. ET AL. Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, Davis, v. 3, n. 6, p. 423– 453, ago. 2004.

BOULÉ, M. W.; COURTNEY, B.; MACKAY, F.; AKIRA, S.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; RIFKIN, I. R. Toll-like receptor 9-dependent and –independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. **Journal of Experimental Medicine**, [S.I.], v. 199, n. 12, p. 1631-1640, jun. 2004.

BRUNNER, H.I et al. Sensitivity of the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, British Isles Lupus Assessment Group Index, and Systemic Lupus Activity Measure in the evaluation of clinical change in childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, [S.I.], v.42, n.7, p. 1354-1360, 1999.

CABRERA, M.C.G et al. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **Journal Physiology**, [S.I.], v.567, [S.N], p.130-120, 2005.

CAMERA, E.; PICARDO, M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. **Journal of Chromatography**, Rome, v. 781, n. 1-2, p. 181-206, dez. 2002.

CECARINI, V et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.I.], v.1773, p. 93-104, ago, 2006.

CROKER, J.A.; KIMBERLY, R. P. SLE: challenges and candidates in human disease. **Trends in immunology**, Birmingham, v. 26, n. 11, p. 580-586, nov. 2005.

CNUBBEN, N.H.P et al. The interplay the glutathione-processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S.I.], v.10, p. 141-152, 2001.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical Hematology**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 8 ed, 1995.

D'CRUZ, D.P *et al.* Systemic lupus erythematosus. **Lancet**, London, v. 369, p. 587-596, fev, 2007.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutricion, Metabolism & Cardiovascular Disease.**, Parma, v. 15, n. 4, p. 316-328, ago. 2005.

DEVASAGAYAM, T. P. A. *et al.* Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. **Journal of Association of Physicians of India**, [S.I.], v. 52, p. 794-804, 2004.

- DRAPER, H.H et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology & Medicine**, [S.I], v.15, p. 353-363, 1993.
- D'SOUZA, A et al. Detection of catalase is a major protein target of the lipid peroxidation product 4-HNE and the lack of its genetic association as a risk factor in SLE. **BMC Medical Genetics**, [S.I], v. 9, n.62, p.1-8, 2008.
- ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLMER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonemal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, [S.I], v. 11, p. 81- 128, 1991.
- EVANS et al. Aberrant processing of oxidative DNA damage in Systemic Lupus Erythematosus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. United Kingdom, v. 273, n.3, p. 894-898, 2000.
- FERNANDÉZ, J et al. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation for in meat. **Food chemistry**, [S.I], v.59, n.3, p. 345-353, 1997.
- FINE, D.M. Pharmacological therapy of lupus nephritis. **Jama**, Baltimore, v. 293, n. 24, p. 22-29, jun. 2005.
- FORSBERG, L.; FAIRE, U.; MORGENSTERN, R. Oxidative Stress, Human Genetic Variation, and Disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 389, n. 1, p. 84–93, 2001
- FRANKEL, E.N.; NEFF, W.E. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.I], v. 754, p. 264- 270, 1983.
- GARG, D.K.; ALI, R. Reactive Oxygen Species modified polyguanylic acid: immunogenicity and implications for autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, [S.I], v.11, p.371-378, 1998.
- GENESTRA, M. Oxy radicals, redox-sensitive, signaling cascades and antioxidants. **Cellular signaling**, [S.I], v. 19, p. 1807-1819, abr, 2007.
- GROTTO D et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography- visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.I], v.43, p. 619-624, 2007.
- GUZMAN, J et al. Measurement of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. Prospective validation of 3 clinical studies. **Journal Rheumatology**, [S.I], v. 19, p.1551-1558, 1992.
- GWINNER, W.; GRONE, H. J. Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Hannover, v. 15, n. 8, p. 1127-1132, ago, 2000.

- JÚNIOR, L.R. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, jan/fev. 2001.
- KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **APMIS**, Filand, v. 115, p. 81-103, 2007.
- KHANNA, S et al. The relationship between disease activity and quality of life in Systemic Lupus Erythematosus. **Rheumatology**, [S.I], v. 43, p.1536-1540, set, 2004.
- KURIEN, B.T.; SCOFIELD, R.H. Free radical mediated peroxidative damage in Systemic Lupus Erythematosus. **Life Sciences**, v.73, p.1655-1666, mar, 2003.
- LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clínica Chimica Acta**, Denmark, v. 380, n. 1-2, p. 50-58, maio. 2007.
- LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. **The veterinary Journal**, p.2-10, jun, 2006.
- MANSOUR, R.B et al. Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxido dismutase associated with oxidative stress in patients with Rheumathoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, [S.I], v. 37, n.2, p. 103-108, 2008.
- MARTINS, R. S.; CARVALHO, M. F.; SOARES, V. A. Glomerulonefrite lúpica: estudo da evolução a longo prazo. **Revista Associação Médica Brasileira**. São Paulo, v. 46, n. 2, p. 121-125, abr/jun. 2000.
- MATTSON, M.P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**. [S.I], v. 7, p.1-7, 2008.
- MONTAVON, P.; KUKIC, K.R.; BORTLIK. A simple method to measure effective catalase activities: optimization, validation, and application in green coffee. **Analytical Biochemistry**, Switzerland, v. 360, p. 207-215, jan. 2007.
- MOREIRA, C.; CARVALHO, M. A. P. **Reumatologia: diagnóstico e tratamento**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 808p.
- NOCTOR, G et al. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal Experimental Botany**, [S.I], v. 49, n. 321, p. 623-647, abr, 1998.
- NUTTALL, S. L., et al. Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus – evidence of increased oxidative stress and dyslipidemia. [S.I], **Rheumatology**, v.42, p.758-762, fev, 2003.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clínica Chimica Acta**, [S.I.], v. 333, n. 1, p. 19-39, jul. 2003.

PETRI, M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Best Practice e Research Clinical Rheumatology**, [S.I.], Baltimore, v. 16, n. 5, p. 847-858, dez. 2002.

POLLARD, K. M.; HULTMAN, P.; KONO, D. H. Immunology and genetics of induced systemic autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, La Jolla, v. 4, n. 5, p. 282-288, jan. 2005.

PRYOR, W.A.; STANLEY, J.P. A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. **Journal of Organic Chemistry**, [S.I.], v.40, p. 3615-3617, 1975.

QING, X.; PUTTERMAN, C. Gene expression profiling in the study of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, New York, v. 3, n. 7-8, p. 505-509, nov. 2004.

RADAK, Z et al. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, [S.I.], v.44, p. 153-159, jan, 2008.

RAHMAN, I et al. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airways diseases. **Europeun Journal of Pharmacology**, [S.I.], v.533, p. 222-239, 2006.

ROVENSKÝ, J.; TUCHYNOVÁ, A. Systemic Lupus Erythematosus in the elderly. **Autoimmunity Reviews**, [S.I.], v.7, p.235-239, 2008.

SARBAN, S et al. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinical Biochemistry**, [S.I.], v. 38, p.981-986, set, 2005.

SATO, E.I et al. Consenso Brasileiro para o tratamento do LES. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.42, n.6, p. 362-370, 2002.

SCOFIELD, R. H. *et al.* Modification of lupus-associated 60-kDa Ro protein with the lipid oxidation product 4-hydroxy-2-nonenal increases antigenicity and facilitates epitope spreading. **Free Radical Biology & Medicine** [S. I.], v. 38, n. 6, p. 719-728, 2005.

SIMARD, J.P; COSTENBADER, K.H. What can epidemiology tell us about Systemic Lupus Erythematosus? **Clinical Practice**, [S.I.], v.61, n.7, p. 1170-1180, jul, 2007.

SUKKAR, S. G.; ROSSI, E. Oxidative stress and nutritional prevention in autoimmune rheumatic diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 3, p. 199–206, 2004

SVENUNGSSON, E. Cardiovascular disease in Systemic Lupus Erythematosus. Karolinska Institute, Department of Medicine, Unit of Rheumatology, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden, p.1-75, 2003.

TAM, L. S et al. Effects of vitamins C and E on oxidative stress markers and endothelial function in patients with Systemic Lupus Erythematosus: A double blind, placebo controlled pilot study. **The Journal of Rheumatology**, Hong Kong, v. 32, p. 275-282, set, 2004.

TEWTHANOW, K et al. Correlation of lipid peroxidation and glutathione levels with severity of Systemic Lupus Erythematosus: a pilot study from single center. **J Pharm Pharmaceut Sci**, [S.I.], v. 11, n.3, p.30-34, jun, 2008.

TSUKUMO, S.; YASUTOMO, K. DNaseI in pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, [S.I.], v. 113, n. 1, p. 14-18, out. 2004.

TURGAY, M et al. Oxidative stress and antioxidant parameters in a Turkish group of patients with active and inactive systemic lupus erythematosus. **Journal of Rheumatology**, [S.I.], v. 10, p.101-106, 2007.

URSO, M.L et al. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, [S.I.], v. 189, p. 41-54, 2003.

VILAR, M.J.; SATO, E.I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region. **Lupus**, [S.I.], v.11, p.528-32, 2002.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO

“AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO”

Dados de identificação do sujeito da pesquisa.

Nome do paciente: _____
Documento de Identidade n° _____
Sexo _____
Data de Nascimento ____/____/_____
Endereço _____ N° _____ Apto _____
Bairro _____ Cidade _____ CEP _____
Telefone _____

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**” acima citado que estou desenvolvendo com a equipe de médicos do Hospital Universitário Onofre Lopes. Esse estudo é necessário para um maior esclarecimento sobre a relação de estresse oxidativo no LES.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue periférico, que serão coletadas no Setor de coleta do Laboratório Integrado de Análises clínicas-LIAC e no ambulatório e enfermarias Hospital Onofre Lopes. O risco a saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Inicialmente, será coletada uma amostra de sangue para a avaliação das enzimas antioxidantes e avaliação da função renal e sua participação no estudo se encerra. Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários sem qualquer custo. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação.

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode retirar-se a qualquer momento do estudo, sem penalidades ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Hospital Onofre Lopes não será afetado.

Os dados e os resultados obtidos durante a investigação serão confidenciais e não serão revelados a terceiros, a menos que sua autorização prévia seja obtida. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desse estudo forem publicados em revistas, artigos e serem tema de debate e aulas.

Por quaisquer motivos adequados, independentes de seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no estudo. O motivo lhe será explicado e poderá ser devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outras complicações se continuar a participação, cancelamento do estudo pela coordenação do estudo, caso o sujeito não cumpra as orientações ou outras questões administrativas.

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, ou se ocorrer lesão ou doença relacionada a investigação você poderá entrar em contato com o pesquisador Tatiana Xavier da Costa (telefones: 3219-2531/ 8825-1752), a qualquer hora do dia.

Eu, _____ declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar do presente Protocolo da Pesquisa.

Natal, _____ de _____ de 20_____

Assinatura do sujeito da pesquisa

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida para você pelo pesquisador

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO LÚI ERMATEMATOSO SISTÊMICO”**. Sendo assim, necessitamos de algumas respostas para nos auxiliar no referido estudo.

1. Está em jejum? () sim () não
Quantas horas? _____

1. Faz uso de cigarro? () sim () não
Quanto tempo parou de fumar antes da coleta? _____

2. Faz exercícios físicos? () sim () não
Quanto tempo parou os exercícios antes da coleta? _____
Qual tipo de exercício físico? _____

3. Faz uso de algum medicamento? () sim () não
Quais? _____
Está utilizando no momento? _____

4. Faz uso de álcool? () sim () não
A quanto tempo parou de beber antes da coleta? _____

5. Está doente no momento? () sim () não

6. Tem alguma doença crônica?
() Diabetes mellitus
() Hipertensão Arterial Sistêmica
() Alergias
() Doença autoimune Qual? _____
() Outras Quais? _____

Assinatura do sujeito da pesquisa

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

ANEXO A

Crêterios da *AMERICAN RHEUMATISM ASSOCIATION* para a classifica o do Lúpus Eritematoso Siste mico (Revistos em 1982)

-
- 1.** Rash malar
 - 2.** Rash discóide
 - 3.** Fotossensibilidade
 - 4.**  lceras da mucosa oral
 - 5.** Artrite não-deformante
 - 6.** Serosite (pleurite, pericardite)
 - 7.** Doena renal (proteinúria persistente, cilindrúria)
 - 8.** Envolvimento do sistema nervoso central
 - 9.** Alteraes hematológicas (anemia, leucopenia, plaquetopenia)
 - 10.** Alteraes imunológicas: células LE, anti-DNA, anti-Sm, VDRL falso-positivo
 - 11.** Fator antinúcleo positivo
-

FONTE: RIELLA, 1996

ANEXO B (Mex-SLEDAI)

Critérios clínicos e laboratoriais do Mex-SLEDAI (Guzman et al, 1992)

Pontuação se as alterações estão presentes na ocasião da visita ou nos 10 dias precedentes

PESO	DESCRITOR	DEFINIÇÃO
8	Alteração neurológica	Psicose. Acidente cérebro-vascular. Convulsão. Síndrome mental- orgânica. Mononeurite. Mielite
6	Alteração renal	Cilindrúria. Hematúria > 5 hemácias/ campo. Proteinúria > 0,5 g/L urina simples. Creatinina > 5 mg/dL
4	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos dolorosos nos dedos, infarto periungueal, splinter hemorrágico. Biópsia ou angiografia revelando vasculite
3	Hemólise/ Trombocitopenia	Hb < 12 g/dL e reticulocitose corrigida > 3%. Trombocitopenia < 100.000/mm ³
3	Miosite	Fraqueza muscular proximal com elevação da CPK
2	Artrite	Mais de 2 articulações com edema e derrame
2	Alteração mucocutânea	Rash malar. Ulceração naso-faríngea. Alopecia.
2	Serosite	Pleurisia. Pericardite. Peritonite.
1	Febre/ Fadiga	Febre > 38°C e fadiga inexplicada.
1	Leucopenia/ Linfopenia	Leucopenia < 4000/mm ³ . Linfocitopenia < 1200/mm ³