

O sistema antioxidante na asma brônquica Condicionalismos do processo de envelhecimento

Ana Todo-Bom¹, Teresa Proença³, Catarina Resende Oliveira³, Luís Cardoso Oliveira²,
Celso Chieira¹

¹ *Unidade de Imunoalergologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra*

² *Centro de Pneumologia Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra*

³ *Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra*

Resumo

O Processo de envelhecimento induz modificações imunoinflamatórias próprias, que vão, em larga medida, condicionar as capacidades adaptativas do indivíduo às agressões do meio que o rodeia. A asma brônquica é uma patologia com prevalência crescente em todos os países desenvolvidos e que afecta todos os grupos etários. Tratando-se de uma doença inflamatória crónica de etiologia multifactorial, interessa identificar os diferentes factores implicados na sua etiopatogenia ou gravidade. O stress oxidativo em resultado da produção acrescida de Espécies Reactivas de Oxigénio-ROS ou da redução das defesas anti-oxidantes, está aparentemente ligado à longevidade das diferentes espécies animais e interfere na fisiopatologia da inflamação brônquica crónica. A rotura deste equilíbrio, em grupos etários mais avançados, independentemente da causa, terá repercussão noutros órgãos e sistemas, condicionando em larga medida, a qualidade de vida do indivíduo afectado.

O objectivo deste trabalho é avaliar a importância dos vários mecanismos de defesa antioxidante no processo de envelhecimento e na fisiopatologia da asma brônquica .

Foram seleccionados para o estudo um grupo A de 27 indivíduos saudáveis com uma média de idades de 40.7 ± 9.6 anos e um grupo B de 103 idosos (com mais de 65 anos) com uma média de idades de 75.8 ± 6.8 anos. O grupo B, de idosos, incluía 41 indivíduos saudáveis com média de idades de 78.8 ± 7.0 anos que constituíam o grupo C e um grupo de doentes asmáticos com média de idades de 72.3 ± 5.0 anos que constituíam o grupo D.

No grupo A e B procedeu-se à determinação do Capacidade Antioxidante Total -TAS; Nos grupos C e D procedeu-se a aplicação de inquérito clínico, testes cutâneos de alergia por picada, determinação plasmática de TAS, de Malonildialdeído- MDA, de Glutatião reduzido -GSH, de Vitamina A e de Vitamina E e ainda determinação celular, no glóbulo vermelho-Gv, de Superóxido dismutase-SDO, de MDA, de GSH, de Glutatião peroxidase-GIHx e de Vitamina E. No grupo D foi ainda realizado estudo funcional ventilatório.

Os valores de TAS no grupo A foram de 1.0mM e no grupo B de 0.83mM.

No grupo D, os doentes estavam clinicamente estabilizados, com valores médios de VEMS de 73.6 %, apresentando em 34% dos casos polissensibilização, em 14% sensibilização isolada a ácaros e em 8% a polen.

No grupo B os valores de MDA foram de 1.9 mM e correlacionaram-se directamente com a idade.

Dos resultados laboratoriais nos grupos C e D destacam-se como mais relevantes e com diferenças entre grupos estatisticamente significativas os seguintes: valores de TAS no grupo C, 0.92mM e no grupo D 0.78mM; valores de SDO no grupo C 829.0 U/gr hg e no D 669.2 U/gr hg;

valores de GSH Gv no grupo C 15.6mmol/grhg e no grupo D 12.4 mmol/grh; valores de vitamina E Gv no Grupo C 7.2 nmol/grhg e no Grupo D de 14.2 nmol/grhg.

O conjunto dos resultados confirmam o impacto do stress oxidativo em patologia respiratória e alérgica que será particularmente importante entre a população mais idosa.

Neste grupo etário o desequilíbrio entre agressão oxidativa e capacidade residual de defesa será determinante na longevidade e na qualidade de vida.

A crescente informação disponível sobre esta vertente etiopatogénica tem de ser integrada na complexa atitude profilática e terapêutica desta patologia.

Abstract

The ageing process cause immunologic and inflammatory changes that will determine the individual ability to face external challenges throughout the all life. The bronchial asthma prevalence has been increasing in all developed countries, in all age groups. Being a chronic inflammatory disease it is important to identify different triggers involved in its severity. The oxidative stress as a result of Reactive Oxidative Species-ROS, increased production or as a result of anti oxidant defence decrease is probably associated with life longevity within different animal species and linked to pathophysiology of chronic bronchial inflammation. The lost of oxidant and antioxidant equilibrium, mainly in older people will affect other unrelated organs and global life quality.

The aim of this work is to evaluate the importance of different antioxidants defence mechanisms in the ageing process and in the pathophysiology of bronchial asthma.

A group A of 27 health individuals, mean age 40.7±9.6years, and a group B of individuals older than 65 years, mean age 75.8±6.8 years were studied. . This group included 41 aged health individuals, group C, mean age 78.8±7.0 years and a group of asthmatic patients D, mean age 72.3 ±5.0 years.

In A and C groups the TAS determination was performed; In C and D groups a clinical questionnaire was applied, skin prick tests to common aeroallergens were done, and also determined serum values of total antioxidant species-TAS, MDA, glutathione -GSH, Vit. A and Vit E. Finally superoxide dismutase-SDO, Malonildialdeide-MDA, GSH, glutathione peroxidase-GIHx and Vit E cellular analyses was also performed. D group patients did also lung function tests.

TAS group A values were 1.0mM and group B were 0.83mM.

All patients of D group were stabilised with FEV1 values of 73.6 %, and 34% of D group cases was polysensitised, 14% had isolated sensitisation to mites and 8% to pollen grains.

In B group MDA values were 1.9 mM and were related to age.

The main lab results in groups C and D with statistical significance showed: TAS C group values 0.92mM e group D 0.78mM. The SDO values C group were 829.0 U/gr hg and D group 669.2 U/gr hg. GSH Gv C group were 15.6mmol/grhg and D group were 12.4 mmolgrhg ; Vitamin E Gv Group C were 7.2 nmolgrhg and Group D were 14.2nmolgrhg.

These results confirm the impact of oxidative stress in respiratory and allergic pathology mainly in older population.

This reality is really important in elderly because it seems to be involved also both in life longevity and life quality.

This knowledge must be considered in prophylactic and therapeutic decisions in these pathologies.

INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento apresenta condicionalismos e especificidade próprios que interessa desvendar no sentido de compreender as transformações decorrentes desta evolução natural. O

ser humano começa a envelhecer no dia em que nasce e as modificações que ocorrem ao longo da sua vida são inevitavelmente resultado da sua herança genética modulada pelos condicionalismos do ambiente que o rodeia. As diversas doenças que ocorrem de forma cumulativa durante a vida hu-

mana fazem parte dessa acção modeladora presente nos indivíduos idosos que são submetidos a estudos de investigação clínico-laboratorial nesta faixa etária.

O processo de imuno-senescência, com modificação na resposta imune e inflamatória, reduzida em algumas das suas vertentes e ampliada noutras é a prova da complexidade evolutiva da natureza humana.

O aumento da esperança de vida permitiu retirar ensinamentos sobre aspectos menos clarificados de patologias crónicas com desenvolvimentos diversificados. Entre as mais bem estudadas destacam-se as doenças cardiovasculares, neurológicas e oncológicas que têm merecido particular atenção já que, são as mais conotadas com idade mais avançada e com o processo natural de viver.

A pesquisa de factores de risco para estas patologias crónicas e evolutivas centrou-se entre outros, no estudo dos processos de oxidação e mecanismos de defesa anti-oxidante. A terminologia “oxidante” é aplicada de forma simplificada às Espécies Reactivas de Oxigénio-ROS, e, de acordo com trabalhos recentes, os radicais de oxigénio estarão envolvidos no processo de senescência.

Já em 1956 Harman defendeu a teoria da ocorrência *in vivo* da geração endógena de radicais de oxigénio, que teriam acção nas principais biomoléculas – DNA, lipídios e proteínas. Esta teoria adquiriu mais consistência com a identificação em 1969 do enzima Superóxido Dismutase-SOD. A mitocôndria seria a principal fonte de oxidantes endógenos decorrente do processo de produção de energia e já foi demonstrado que indivíduos com maior longevidade tem uma menor produção de ROS.¹

Existem sem duvida vários locais de produção de oxidantes quatro dos quais tem motivado particular atenção: o transporte mitocondrial de electrões, o metabolismo peroxidativo dos ácidos gordos, as reacções do citocromo P 450 e as células fagocíticas durante os “burst” respiratório. Além destas fontes existe um elevado numero de enzimas capazes de gerar oxidantes em condições nor-

mais e patológicas. Vários isoenzimas da sintetase do oxido nítrico que estão envolvidas na produção de Oxido Nítrico-NO, fundamental em processos de regulação vascular e na resposta imune podem potenciar outras reacções oxidativas com caracter destruidor.²

Os alvos principais destes oxidantes endógenos são os lipídios, os ácidos nucleicos e algumas proteínas. Para fazer face as estas agressões as células estão equipadas com um extenso repertório de enzimas antioxidantes. A superóxido dismutase - SDO, que inactiva o O₂, a glutathiona peroxidase - GIPx e catalase, que actuando ambas sobre o peróxido de hidrogénio-H₂O₂- e transformando-o em H₂O são “eliminadores” enzimaticos; O acido ascórbico, vitamina E e glutathiona reduzida (GSH) fazendo parte das defesas não enzimáticas actuam de maneira interligada e podem ter particular importância a nível terapêutico.³

Daqui resulta que o metabolismo dos radicais de oxigénio é dinâmico surgindo lesão se cresce a geração de agressão oxidante ou redução da defesa anti oxidante ou ainda se falha o processo de reparação consequente.

A asma brônquica é uma doença inflamatória crónica envolvendo as vias aéreas centrais e periféricas. Num elevado numero de doentes tem etiologia alérgica e resulta de uma resposta exagerada aos alergenos do ambiente. Neste processo estão envolvidos diversos tipos celulares com uma inter-relação estreita destacando-se com fundamentais o mastócito o eosinófilo e o linfócito. A sua evolução arbitrária determina um leque comportamental alargado entre os períodos sintomáticos e de intercrise, com quadros de remissão completa, formas intermitentes e formas continuadas de gravidade variável.⁴

É sabido que a asma crónica, particularmente nas suas formas mais graves, se auto-perpetua, por condições inflamatórias locais que conduzem a progressiva deterioração da função respiratória.

As modificações na resposta imune que ocorrem ao longo da vida resultam em padrões de resposta aos antigénios que vão sendo progressivamente modificados.⁵

Os oxidantes podem ter um papel determinante na patogênese de algumas doenças pulmonares e brônquicas. Num ambiente naturalmente enriquecido em oxigênio os efeitos tóxicos dos oxidantes devem ser cuidadosamente contrabalançados pelo diversos sistemas de defesa antioxidante de forma a conservar normal a função celular a este nível.

A infiltração celular decorrente do processo inflamatório que ocorre nas vias aéreas propicia a produção acrescida de proteases e de oxidantes.

Estudos recentes demonstraram que os eosinófilos geram oxidantes através da Peroxidase eosinofílica-EPO na asma desencadeada por contacto com alérgeno. Os eosinófilos podem ainda favorecer a produção de Espécies Reactivas de Nitrogênio- RNS, como o NO que está aumentado na asma com conseqüente modificação oxidativa de proteínas.⁶

Durante a activação eosinofílica o fagócito sujeita-se a um “bust” respiratório gerando O₂ e o seu produto de dismutação H₂O₂. Simultaneamente são libertados os seus grânulos secretórios incluindo a EPO.

O stress oxidativo é uma situação em que existe um aumento da exposição a oxidantes associada ou não à redução do aporte de antioxidantes.

No ambiente pulmonar do indivíduo saudável existe uma presença importante de factores como o glutatião, superóxido dismutase, catalase, vitamina A, C e E e ainda antioxidantes de baixo peso molecular para dar resposta a oxidantes ambientais e do metabolismo celular.

Se a agressão oxidativa se torna dominante surgem lesões na função de proteínas, lipídios e ADN com inactivação das antiproteases e agressão directa ao tecido conjuntivo. Os elementos oxidantes provocam elevação da resposta inflamatória e recrutamento celular.

Existem evidências várias de que a doença atópica tem vindo a aumentar. Considera-se atopia como uma condição hereditária com propensão para produção de IgE que reage especificamente com alérgenos, desencadeia sintomas do tipo imediato e positiva testes cutâneos de hipersensibilidade por picada⁷. Estudos epidemiológicos realizados na

população geral indicam que se observa igualmente um acréscimo importante das situações de asma brônquica, que nos EUA se situa entre os 4,5 % e os 9 % no grupo etário com mais de 65 anos.^{8,9,10}

METODOLOGIA

População

A população escolhida para o estudo era constituída por 27 adultos saudáveis com 40,7±9.6, anos de idade (Grupo A) e 103 idosos (Grupo B), com mais de 65 anos de idade, não fumadores seleccionados a partir de uma população inicial de 250 indivíduos que frequentavam Centros de Dia (Grupo C) ou Consulta de Imunoalergologia (Grupo D). O Grupo C era constituído por 41 idosos saudáveis e o Grupo D incluía 62 asmáticos idosos. Foram considerados critérios de exclusão a presença de patologia sistémica, nomeadamente autoimune ou neoplásica, diabetes, dislipidemias, patologia hepática, cardíaca ou renal e ainda historia de infecção nas ultimas 6 semanas, ou de exposição recente a factores ambientais de risco.

A asma foi definida de acordo com as *Guide Lines* da Sociedade Americana Torácica, incluindo a recorrência dos sintomas respiratórios e a reversibilidade da obstrução das vias aéreas. Nenhum dos doentes asmáticos apresentava exacerbação recente ou modificação da medicação de base.

Nenhum doente cumpria corticoterapia sistémica e todos cumpriam corticoterapia inalada em doses entre 250 e 500mg de dipropionato de beclometasona diários.

Exames Complementares

Todos os idosos foram sujeitos a observação clínica para confirmação diagnóstica e exclusão de outra patologia.

Foi igualmente realizado a todos os indivíduos do grupo B um estudo analítico sumário que in-

cluía análise bioquímica do sangue (glicose, creatinina, transaminases, lipídios) e hemograma para complementar a informação recolhida pela história clínica.

Os doentes do grupo D foram submetidos a estudo de função ventilatória com realização de espirometria em espirometro Vitalograph Compact para determinação do Volume Expiratório Máximo Segundo-VEMS. Para avaliação de reversibilidade além do estudo basal efectuou-se uma prova de broncodilatação com 200 mg de salbutamol inalado.

Foram realizados a todos os indivíduos incluídos no estudo testes cutâneos de alergia por picada-prick, aos aeroalergénios comuns (ALK-ABELLO) e que incluía *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria tenuis*, *Blatella germanica*, Gato, Cão, *Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum officinale*, *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Platanus*, *Quercus suber* e *Olea europaea*.

Como controlo positivo foi incluído cloridrato de histamina (10mg/ml) e como controlo negativo uma solução glicero-salina.

Os extratos alergénicos foram colocados na face anterior dos antebraços a uma distância de 3 cm entre eles e entre as articulações adjacentes e a picada realizada com lancetas metálicas tipo Morrow-Brown aplicadas perpendicularmente à pele com a profundidade de 1mm (Prick Lancetter-Dome Hollister Stier).

Após 20 minutos foram efectuadas as leituras dos diâmetros médios das pápulas em milímetros sendo considerados positivos as com diâmetro igual ou superior ao do controlo positivo e pouco positivos com diâmetro igual a dois terços do controlo positivo. Em todos os casos o diâmetro da pápula nos testes positivos foi igual ou superior a 3mm.

Metodologia laboratorial

Uma amostra de 10 ml de sangue venoso, colhido com heparina sódica para tubo de polipropileno, foi centrifugada a 3000 rpm, a 4° C, durante 10 minutos para obtenção do plasma, onde se procedeu, em todos os indivíduos do Grupo B à determinação das concentrações de Glutatião reduzido (GSH), Malonildialdeído (MDA), Vitaminas A e E e Capacidade Antioxidante Total (TAS). No Grupo A foi apenas determinado a TAS. A fracção de eritrócitos foi lavada três vezes com cloreto de sódio 0,9 %, efectuando centrifugações a 3500 rpm durante 10 minutos, a 4°C. O concentrado de hemácias foi alíquotado e congelado a -80°C, para posterior quantificação, no Grupo B, de MDA, GSH, Vitaminas A e E e medição das actividades enzimáticas da Glutatião peroxidase e da Superóxido dismutase.

O doseamento de GSH plasmático e eritrocitário foi efectuado usando reagentes comercializados pela Oxis International, Inc. sob a designação “Bioxitech GSH-400”, segundo método colorimétrico baseado na reacção com metilsulfato 4-cloro-1-metil-7-trifluorometil-quinolium.

O MDA, no plasma e eritrócitos, após hidrólise ácida na presença de ácido tiobarbitúrico, foi quantificado em sistema isocrático HPLC, Gilson, equipado com coluna analítica Spherisorb 5 mm ODS2 (4.6 x 250 mm), detector UV-Vis e injector automático de amostras, modelo 234, usando como fase móvel a mistura de 400 ml de metanol com 600 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6.8, fluxo 1 ml/min, sendo a calibração efectuada com 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

O doseamento simultâneo das vitaminas lipossolúveis A e E foi efectuado por HPLC em fase reversa pelo método descrito por Milne, 1986 e modificado por Zaman, 1993. Os reagentes utilizados, adquiridos a Bio-Rad Laboratories GmbH, são comercializados sob a designação “Vitamin A/E by HPLC”.

Para avaliação da capacidade antioxidante total

do plasma foram utilizados reagentes da Randox comercializados sob a designação “Total Antioxidant Status”, segundo metodologia baseada na capacidade plasmática de inibição de formação do cátion radical $ABTS^+$ (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotazolina sulfonato]) de cor azul-esverdeada, cuja absorvância é mensurável a 600 nm.

A actividade enzimática da glutatião peroxidase (GlpX) eritrocitária foi medida espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por Plagia e Valentine em 1967, modificado por Wendel, usando tert-butilhidroperóxido como substrato, sendo a formação de glutatião oxidado (GSSG) monitorizada por quantificação da oxidação do NADPH a $NADP^+$ a 340 nm, tendo sido a variação de absorvância registada em espectrofotómetro UVIKON UV-Vis termostatizado.

A actividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) eritrocitária foi avaliada usando o método de McCord e Fridovich descrito por Flohé e Ötting, com base na inibição da velocidade de redução do citocromo-C pelo radical superóxido gerado no sistema xantina/xantina oxidase, onde a variação de absorvância foi igualmente medida em espectrofotómetro UVIKON UV-Vis termostatizado.

A análise estatística dos diversos parâmetros analisados foi efectuada, por comparação das médias registadas, através do teste de *t de Student*, sendo considerado significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

No grupo controlo - Grupo A - com 27 indivíduos com $40,7 \pm 9,6$ anos de idade, 13 eram do sexo masculino e 14 do sexo feminino. No Grupo B, constituída por 103 idosos, com média de idade de $75,8 \pm 6,8$ anos, 68 eram do sexo feminino e 35 do sexo masculino. Este grupo B era constituído por 41 idosos saudáveis - Grupo C com média de idades de $78,8 \pm 7,0$ anos e 62 asmáticos-Grupo D, com média de idades de $72,3 \pm 5,0$ anos.

A observação clínica foi compatível com a inexistência de qualquer patologia associada. Os re-

sultados do estudo analítico sumário foram normais. Nenhum dos doentes referia agravamento recente das queixas respiratórias nem necessidade de recurso à urgência por crise nos 12 meses precedentes.

Os testes de função respiratória realizados a todos os doentes asmáticos revelaram obstrução brônquica moderada com valores médios de VEMS de 73,6 % do teórico previsível apresentando, 18 doentes, valores inferiores a 60 %.

De acordo com os testes cutâneos de alergia 14 doentes apresentavam reactividade cutânea moderada aos alergenios testados, com diâmetros das pápulas inferiores á histamina e 36 apresentavam reactividade cutânea marcada com diâmetro das pápula igual ou superior ao da histamina. 12 indivíduos asmáticos tinham testes cutâneos negativos.

A maioria dos doentes apresentava sensibilizações múltiplas, sendo 34% simultaneamente sensíveis a polen, ácaros e outros alergenios. Em 14% dos doentes foi observada uma sensibilização isolada a ácaros e em 8% a polen (Fig. 1).

Na amostra total de indivíduos idosos, Grupo B, os valores médios encontrados no plasma para os parâmetros relacionados com o processo de agressão e defesa oxidativa foram os seguintes: $26,4 \pm 8,6$ mM para a vitamina E, $21,9 \pm 26,9$ mM para a Vitamina A, $246,0 \pm 147,7$ mM para a GSH, e $1,9 \pm 1,0$ mM para a MDA.

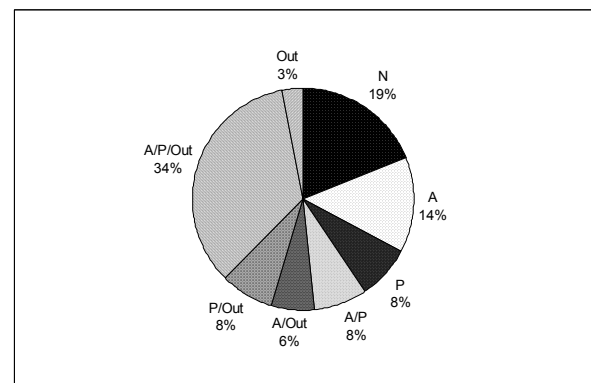


Figura 1. Distribuição percentual dos padrões de sensibilidade cutânea encontrados.

N: Negativo; A:Ácaros; P:Polen; Out: Outros.

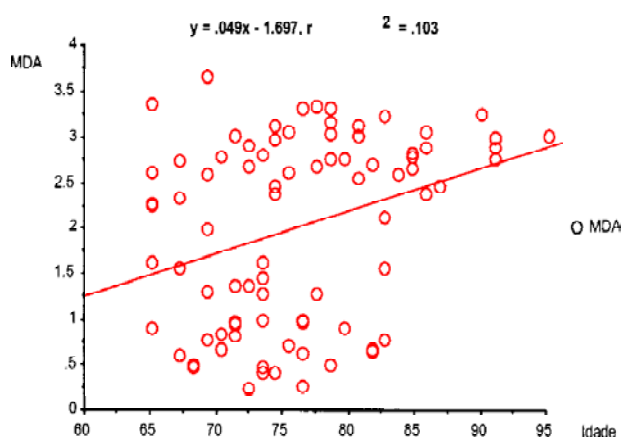


Figura 2. Curva de regressão obtida entre os valores de MDA plasmático e a idade $P < 0,05$

No glóbulo vermelho (Gv) foram encontrados valores de $732,6 \pm 240$ U/gr hg (hemoglobina) para a SDO, de $8,9 \pm 2,7$ U/gr hg para o GIPx Gv, de $1,7 \pm 4,7$ mmol/grhg, para o GSH Gv, de $34,9 \pm 16,2$ nmol/grhg para o MDA Gv e de $10,9 \pm 8,1$ nmol/grhg para a Vit E Gv. Foi observada uma correlação positiva entre os valores de MDA e a idade ($p < 0,05$) (Fig. 2). Nos outros parâmetros analisados não foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre os valores encontrados e a idade.

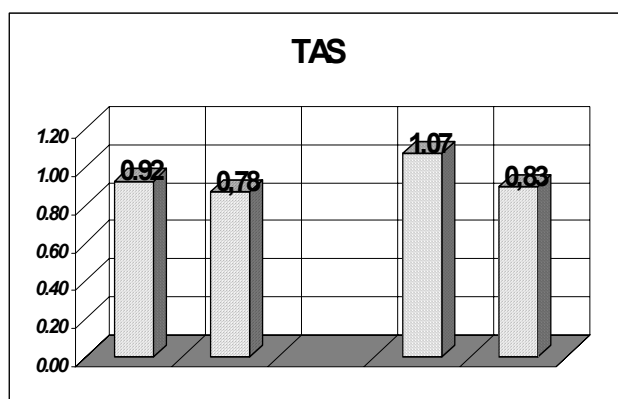


Figura 3. Valores de TAS em idosos saudáveis /Grupo C (0.92) e em idosos asmáticos/Grupo D (0.78). Valores de TAS em controles saudáveis/Grupo A (1.07) e no grupo de idosos/Grupo B (0.83).

O valor médio de TAS no grupo controlo-Grupo A foi de $1,07 \pm 0,12$ mM e no grupo B de $0,83 \pm 0,17$ mM ($p < 0,05$) (Figura 3)

A análise comparativa dos dois grupos de idosos-Grupos C e D, que foram estudados relativamente à Capacidade Antioxidante Total revela valores inferiores para o grupo de asmáticos. O valor médio de TSA é de $0,78 \pm 0,18$ mM para o grupo dos asmáticos e de $0,92 \pm 0,10$ mM para o grupo controlo, sendo a diferença observada entre grupos estatisticamente significativa ($P < 0,05$) (Fig. 3).

Relativamente ao valor de GSH este foi próximo nos dois grupos estudados, sendo de 246 ± 140 mM no grupo de asmáticos vs $245,0 \pm 160$ mM no de saudáveis idosos. A mesma semelhança foi observada para a vitamina E com valor médio de $27,0 \pm 8,8$ mM no Grupo D e de $25,5 \pm 8,4$ mM no Grupo C.

O grupo de asmáticos analisados apresentavam valores significativamente inferiores da MDA $1,0 \pm 0,7$ mM quando comparados com os determinados para o grupo controlo- $2,8 \pm 0,29$ mM

Para a vitamina A os valores encontrados na população asmática de $1,8 \pm 0,5$ mM são iguais aos da população saudável, Grupo C, que foram também de $1,8 \pm 0,5$ mM

As determinações de antioxidantes em meio celular efectuadas em glóbulos vermelhos revelaram que o valor médio de SDO observado no grupo de asmáticos idosos, Grupo D, era de $669,2 \pm 181,3$ U/grhg significativamente inferior ao dos idosos saudáveis, Grupo C, que era de $829,0 \pm 253,7$ U/grhg ($P < 0,05$) (Fig. 4)

Foram também observados valores significativamente inferiores de GSH nos asmáticos idosos de $12,4 \pm 4,6$ mmol/grhg, Grupo D, comparativamente aos do Grupo C de saudáveis idosos que foram de $15,6 \pm 4,4$ mmol/grhg ($p < 0,05$) Figura 5

Foi também estatisticamente significativa a diferença observada na vitamina E do glóbulo vermelho de asmáticos idosos, Grupo D de $14,2 \pm 9,3$ nmol/grhg vs $7,2 \pm 3,9$ nmol/grhg do Grupo C ($p < 0,05$).

Os outros parâmetros analisados a nível celular foram próximos nos dois grupos estudados, nomeadamente o GIPx com $9,2 \pm 2,9$ U/grhg no Grupo D

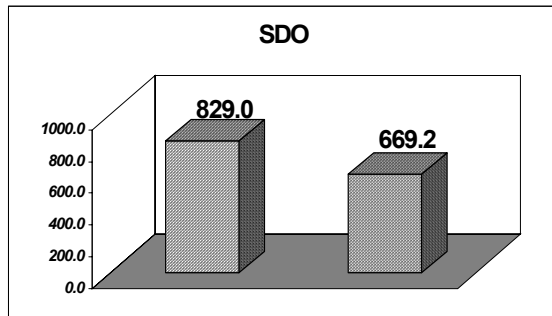


Figura 4. Valores de SDO em idosos saudáveis 829,0 U/grhg e em idosos asmáticos 669,2 U/grhg

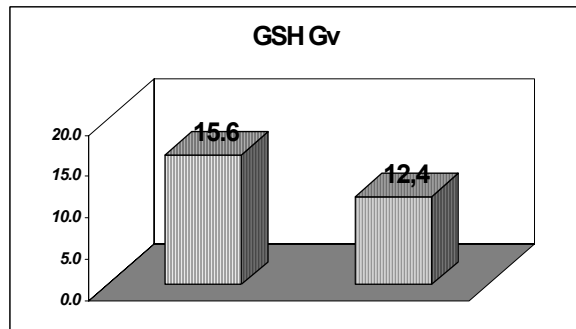


Figura 5. GSH nos asmáticos 12,4 mmol/grhg, Grupo D e no Grupo C de 15,6 mmol/grhg

e $8,5 \pm 2,2$ U/grhg no Grupo C e o MDA globular com valores de $32,5 \pm 21,6$ nmol/grhg no Grupo D e de $37,5 \pm 4,1$ nmol/grhg no Grupo C.

Avaliando apenas os 62 doentes idosos com asma brônquica, do Grupo D, relativamente aos

parâmetros que apresentaram diferenças estatisticamente significativas comparativamente ao Grupo C, foi possível observar que a presença de intensa reactividade aos aeroalergenos testados condicionava valores mais elevados de MDA plasmático e mais reduzidos de SDO, embora as diferenças observadas não fossem estatisticamente significativas (Quadro I).

A redução de GSH e da Vitamina E determinadas no glóbulo vermelho era significativamente mais marcada nos asmáticos alérgicos ($p < 0,05$) (Quadro II).

Ainda relativamente aos 62 idosos com asma brônquica, do Grupo D, comparando parâmetros de antioxidantes e de MDA entre os 18 doentes que apresentavam valores de função ventilatória mais comprometida ($VEMS < 60\%$) e os restantes doentes do grupo observaram-se valores semelhantes. Apenas os valores de vitamina E eram significativamente inferiores nos doentes com função ventilatória mais reduzida (Quadro III).

Outros valores encontrados para os doentes com $VEMS > 60\%$ e com $VEMS < 60\%$ (GSH: $233,1 \pm 149,9$ mM vs $247,0 \pm 139,0$ mM; GIPx Gv $8,8 \pm 2,3$ vs $9,4 \pm 3,7$ U/gr hg; GSH Gv: $11,6 \pm 4,8$ vs $12,4 \pm 4,0$ mmol/gr hg; MDA Gv: $28,6 \pm 18,2$ vs $32,4 \pm 26,4$ nmol/gr hg) apresentavam ainda valores muito aproximados.

A vitamina E no glóbulo vermelho apresenta valores superiores de $17,4 \pm 11,2$ nmol/gr hg nos doentes que apresentavam valores de VEMS mais reduzido comparativamente aos que tinham valores mais aproximados da normalidade, de $10,8 \pm 7,2$

Quadro I. Valores comparativos entre idosos asmáticos do Grupo D (n=62), com testes cutâneos fortemente positivos (n=36) e com testes cutâneos negativos (n=12). Não foram incluídos na análise comparativa 14 asmáticos com reactividade cutânea moderada aos alérgenos testados.

	N ^a	MDA	TAS	SDO
Asma				
Testes positivos (+++)	36	$1,2 \pm 0,9$	$0,78 \pm 0,2$	$617,9 \pm 182,1$
Testes negativos	12	$0,76 \pm 0,4$	$0,78 \pm 0,2$	$722,7 \pm 274,4$

Quadro II. Valores comparativos com diferenças estatisticamente significativas entre idosos asmáticos do Grupo D (n=62), com testes cutâneos fortemente positivos (n=36) e com testes cutâneos negativos (n=12). Não foram incluídos na análise 14 asmáticos com reactividade cutânea moderada aos alérgenos testados.

	N ^a	GSH Gv	VIT E Gv
Testes positivos (+++)	36	11,8±4,3	11,98±7,4
Testes negativos	12	15,2±3,9	22,1±11,4
		p<0,05	p<0,05

Quadro III. Valores comparativos entre idosos asmáticos do Grupo D (n=62) relativamente a parâmetros de função ventilatória.

	N ^a	MDA	TAS	SDO	VIT E	VIT A
Asma VEMS > 60%	44	1,2±0,9	0,81±0,2	623,0±182,1	28,9±8,4	1,7±0,4
Asma VEMS < 60%	18	0,94±0,5	0,77±0,2	643,1±145,5	23,2±8,6	1,9±0,5

sendo essa diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

DISCUSSÃO

O presente estudo constitui uma análise simultânea da interferência dos antioxidantes no processo de envelhecimento e na fisiopatologia da asma brônquica no idoso. Procede ainda à caracterização desta entidade clínica num grupo etário mais avançado analisando, nomeadamente, parâmetros como o padrão de sensibilização e o grau de obstrução brônquica.

Com efeito a percentagem de atopia entre os asmáticos idosos pode variar de 13% até cerca de 40 %^{5,8,11,12}. A sensibilização não difere da que é

frequentemente reportada noutras idades e inclui os seguintes grupos de alérgenos : ácaros, fungos, árvores, gramíneas, arbustos e faneras⁹. Estes doentes arbitrariamente seleccionados a partir de uma consulta de imunoalergologia revelaram padrões de reacção intensa a um significativo grupo de alérgenos. A maioria estava polisensibilizado, reconhecendo os grupos de alérgenos mais frequentes da região e encontrava-se num período estável da doença apresentando valores médios de função ventilatória pouco reduzidos relativamente aos teóricos previsíveis para a idade, sexo e constituição física.

De facto os asmáticos idosos são mais alérgicos que a população geral do mesmo grupo etário embora a reactividade cutânea e o valor de IgE tendam a diminuir com a idade.¹³ Em indivíduos pre-

dispostos parece assistir-se a uma aquisição progressiva de sensibilização eventualmente menos exuberante, mas de repercussão patológica não desprezível.

Estes doentes, correctamente medicados, cumpriam corticoterapia inalada e estariam, na sua maioria, clinicamente estabilizados, sem obstrução significativa das grandes vias aéreas.

Neste trabalho foi observada um aumento claro dos níveis de malonildialdeído (MDA), um produto de peroxidação lipídica nas idades mais avançadas, independentemente da existência de patologia brônquica. Outros autores têm referido estes aumentos de malonildialdeído à medida que a idade avança, que se acompanham da redução de vitamina E e está associado ao processo de envelhecimento.^{14,15}

A objectivação do efeito oxidante quando associada a um decréscimo de factores antioxidantes plasmáticos, surge como a concretização da rotura do equilíbrio que ocorre durante o processo de envelhecimento. No presente trabalho foi evidente e estatisticamente significativa a correlação entre os valores de MDA plasmático e o percurso etário.

Para alguns autores o Estado Antioxidante Total - TAS é o parâmetro de eleição para análise da capacidade antioxidante e constituiu-se como um indicador privilegiado para avaliação de grupos e de patologias. Para os seus defensores é possível que a redução isolada de um indicador seja compensada pelo aumento de outro, num equilíbrio dinâmico não completamente detectável por determinações isoladas e por isso incompletas. Da acção das Espécies Reactivas de Oxigénio, ROS, sobre as principais biomoléculas poderá resultar disfunção e morte celular ou uma resposta adaptativa, em grande medida condicionada pela capacidade antioxidante individual, que permitirá a sobrevivência da célula.

Considerando o grupo de idosos na globalidade, grupo B o valor encontrado para o TAS de $0,83 \pm 0,17$ foi muito inferior ao do grupo etário mais jovem, referido com controlo, grupo A e que era de $1,07 \pm 0,12$ concordante com a redução de defesas

que ocorrem neste ponto com o decorrer da idade.

Sendo a asma uma doença caracterizada pela inflamação crónica das vias aéreas as células inflamatórias e epiteliais geram ROS que se correlacionam com a gravidade da doença^{16,17}. Os asmáticos tem ainda valores elevados de Oxido Nítrico e outras Espécies Reactivas Nitrogenadas-RNS nas vias aéreas devido ao aumento do NO sintetase pelas células epiteliais. Mas apesar de um claro aumento do stress oxidativo e nitroxidativo nas vias aéreas dos asmáticos as enzimas antioxidantes celulares não se encontram habitualmente elevadas.^{18,19} No presente trabalho foi observada uma redução significativa do GSH celular dos asmáticos, sendo ainda mais acentuada entre os asmáticos alérgicos, enquanto a Vitamina E celular registava aumentos significativos, estes privilegiando a asma não alérgica. Estas variações podem corresponder a défices que funcionam como factores de agravamento ou resultarem fundamentalmente do consumo originado pela resposta ao processo de agressão continuada. Nestes dados podem estar objectivados fenómenos de compensação celular locais. No plasma os valores de Vitamina E não diferiram significativamente entre idosos asmáticos e não asmáticos. Parece pois que a capacidade antioxidante desta vitamina e o seu papel protector não será muito efectiva desenvolvendo-se a sua acção tendencialmente compensatória, preponderantemente na membrana celular. De igual modo, no presente trabalho, o GSH plasmático não se apresenta como desempenhando uma acção preponderante na fisiopatologia da asma, remetendo-se a importância da sua intervenção para as acções desenvolvidas ao nível da membrana celular.

No Homem as células epiteliais do trato respiratório segregam antioxidantes para o meio extracelular. Antioxidantes como glutathiona, o ácido úrico, vitaminas C e E presentes no fluido de revestimento do epitélio pulmonar têm funções de defesa relativamente à agressão continuada do meio. Estes antioxidantes são consumidos de acordo com exposição e tempo, limitando a oxidação de macromoléculas como lípidios proteínas e carbo-hidra-

tos²⁰. De acordo com alguns autores os asmáticos terão um decréscimo selectivo de SDO, conservando a catalase e a glutatona peroxidase-GIPx valores sobreponíveis à população normal.^{18,21} Neste grupo de asmáticos idosos foi observado uma redução estatisticamente significativa de SDO, concordante aliás com o papel primordial que a SDO desempenha no processo inflamatório brônquico.

Sabe-se ainda que a expressão de mRNA da glutatona peroxidase - eGIPx em células epiteliais brônquicas de asmáticos está aumentada e que ocorrem variações rápidas do GSH após exposição a ROS. Com efeito pode ocorrer uma rápida indução do GSH intracelular como resposta ao stress oxidativo após uma depleção transitória do GSH^{15,22,23}. Outra forma de resposta protectora consiste na importação para o interior celular do GSH expelindo a sua forma oxidada.^{15,22,23} Neste estudo os valores de GIPx são muito próximos entre os idosos independentemente de serem saudáveis ou terem patologia obstrutiva brônquica. Parece assim que este mecanismo de defesa pode estar parcialmente frenado nos doentes mais idosos. Níveis fisiológicos de GSH potenciam a acção dos ROS na expressão de eGIPx, mas a expressão exagerada de SDO previne a indução de GIPx, sugerindo a importância de uma análise dinâmica para uma completa interpretação deste equilíbrio.

As espécies reactivas de oxigénio têm um papel de agressão mas estão igualmente envolvidas em diversas reacções de defesa da célula. Níveis elevados destes antioxidantes podem provocar roturas nestes equilíbrios com consequências imprevisíveis e indesejáveis

Os eosinófilos tem um papel crucial na defesa inata do hospedeiro. O seu recrutamento e activação constitui uma característica da asma, nomeadamente após provocação alérgica. Estas células estão equipadas com um potente arsenal proteico e enzimático destinados a provocar lesão aos seus alvos biológicos. O “burst” respiratório dos eosinófilos humanos produz entre três a dez vezes mais O₂ que o produzido por um número correspondente de neutrófilos. A EPO amplifica o potencial oxi-

dante do H₂O₂ gerado de forma a criar potentes oxidantes reactivos.^{24,25} As Espécies Reactivas de Nigénio - RNS- geradas irão exercer uma acção importante na modificação de proteínas que ocorre no tecido brônquico conforme observado em tecidos de biopsia ou em LLBA de asmas graves⁶. De facto verificou-se no presente trabalho uma redução significativa do TAS dos doentes asmáticos tal com havia sido observado na população idosa e que testemunha de forma mais global a capacidade de intervenção das defesas antioxidantes e dos ROS na patogenia da asma.

Os antioxidantes lipossolúveis actuam na rotura de cadeias oxidantes eliminando os radicais peroxil e assim prevenindo a propagação do processo de peroxidação lipídica²⁶. O retinol funciona como um factor chave para a conservação da diferenciação celular do epitélio broncoalveolar. Uma dieta rica em beta carotenos e em vitamina E, assim como valores séricos mais elevados destes dois elementos podem relacionar-se com uma prevalência reduzida de dispneia e de bronquite crónica, não se observando contudo obtenção de qualquer efeito protector para esta patologia, com o suplemento adicional destas vitaminas²⁷. Neste grupo de asmáticos idosos foram observados valores vitamina A plasmática semelhante entre asmáticos e saudáveis, ressaltando destes dados o caracter protector pouco constante que as vitaminas assumem na defesa antioxidante.

Os valores de MDA no grupo de doentes asmáticos idosos não está aumentado relativamente ao grupo controlo como vem referido em alguns trabalhos. Contudo os estudos realizados nesta patologia não incluíam idades tão avançadas e este parâmetro é susceptível de ser fortemente condicionado pelo factor idade conforme foi discutido acima e é claro no presente trabalho. Determinações realizadas no laboratório onde foi desenvolvido este estudo, incidentes sobre indivíduos saudáveis com média de idades de 63,1 anos encontraram valores inferiores às do grupo de asmáticos idosos e às dos saudáveis idosos do presente trabalho. (dados ainda não publicados) reforçando a implicação que a

idade tem neste indicador biológico. Por outro lado, o grupo de asmáticos incluídos no estudo estava medicado com corticoterapia inalada e clinicamente bem controlado de acordo com os valores médios de função ventilatória. A administração de doses correctas de fármacos antiasmáticos, nomeadamente a associação preconizada de proprionato de fluticasona e de salmeterol respectivamente nas doses de 500 e 100mg/dia durante um mês corrige parcialmente as diferenças positivas de malonildialdeído comparativamente aos controlos e aos asmáticos não tratados tanto no soro como no líquido de lavagem bronco-alveolar. Esta reversão parcial é susceptível de ser objectivada na função respiratória²⁸. Apesar de não ter sido possível encontrar diferenças estatisticamente significativas, comparando o grupo de asmáticos idosos com sensibilização alérgica intensa com o dos asmáticos não alérgicos encontram-se, nos primeiros, valores mais aumentados de MDA e valores ainda mais reduzidos de SDO. Neste trabalho com a metodologia utilizada não foi possível estabelecer uma correlação entre função ventilatória reduzida e indicadores de desequilíbrio oxidativo, a não ser a redução da vitamina E plasmática nos doentes com função pulmonar mais comprometida.

As Espécies Reactivas de Oxigénio e o Stress Oxidativo estão envolvidos no envelhecimento e em processos com ele relacionados, nomeadamente com a HTA, demência e arteriosclerose. A asma brônquica, mesmo quando aparentemente controlada, pode estar associada a uma redução das defesas antioxidantes e condicionar um agravamento adicional destas patologias degenerativas. Nas vias aéreas a lesão do epitélio devido a agressão alérgica e a acção de mediadores inflamatórios conduz ao influxo de proteínas e inflamação reaccional, esta potenciada pela agressão oxidativa. A redução da Capacidade total antioxidante terá um papel determinante na patogénese da asma, particularmente no indivíduo idoso. Acresce ainda que, a intervenção significativa de algumas espécies antioxidantes como o superóxido dismutase e o glutatião peroxidase actuando num equilíbrio dinâmico e em per-

manente mutação constituem de facto, factores de agressão numa idade problemática e que tudo indica deverá constituir a curto prazo uma parcela importante da população geral²⁹. A investigação crescente, dirigida ao esclarecimento da importância fisiopatológica que estes marcadores assumem conduzir, necessariamente, a uma revisão no conceito de profilaxia, de intervenção terapêutica e de monitorização nesta patologia.

BIBLIOGRAFIA

1. Barja G., Mitochondrial oxygen radical generation and leak sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 1999 Aug 31(4) 347-366.
2. Kenneth B., Beckman A., Bruce N. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 1998, 78:547-81
3. Grazina, M. Oliveira, C. Envelhecer Vivendo. *Aspectos Bioquímicos*, 2001, 93:110
4. Todo-Bom, A. Envelhecer Vivendo. *Envelhecimento Alergológico*, 2001, 112:122
5. Braman, S., Kaemmerlen, J., Davis, S. Asthma in the Elderly. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 143, 336:340.
6. Macpherson, J., Comhair, S., Erzurum, S., Klein, D., Lipscomb, M., Samoszuk, M., Hazen, S. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *The Journal of Immunology*, 2001, 166, 5763-5772.
7. Evans R. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. In: *Allergy: principles and practice Part II*. Middleton E, Reed CE (eds), 1993: p1109.
8. Montanaro A., Bardana, E., Immun. *Allergy Clin. Nort Am: Treatment of Asthma and Allergic Disease in the Elderly*. 1997.
9. Asthma in the Elderly. Barbee R. Bloom J. *Lung Biology in Health and Disease*. Vol 108.
10. Yunginger J., Reed C., O Connell E.; A community-based study of the epidemiology of asthma: Incidence Rates, 1964-1983. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 888-94.
11. Ford R. Aetiology of asthma: A review of 11551 cases (1958-1968). *Med J Aust* 1969; 1:628-31
12. Costa A, Mendes A, Santos A, Pregal A, Silva S, Ferreira M, Palma Carlos L, Palma Carlos. Asthma in the elderly retrospective study. *Allergy, Supp* 73, vol 57. 2002, 330.
13. Burrows, B., Lebowitz M.; Barbee R, Cline, M. Findings before diagnoses of asthma among the elderly in a longitudinal study of a general population sample. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 870-877
14. Mehmetcik G, Ozdemiler G, Kanbagli, Toker G, Uysal M, Age-Related Changes in Plasma Lipid Peroxidation and Antioxidant System in Humans and Rats. *Arch Geront Geriatr* 1997, 25 305.
15. Kelly F, Mudway I, Blomberg A, Frew A, Sandstrom T Altered lung antioxidant status in patients with middle asthma. *Lancet* 1999, 354, 9177-92
16. Saleh D, Ernest P, Lim S, Barnes P, Giaid A Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients with induction of nitric oxide synthetase: effect of inhaled glucocorticoid. *Faseb J*, 1998, 12, 929-37.
17. Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Takeda T, The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. *Chest* 1991, 100, 1319-22.

18. Smith L, Shamsuddin M, Sporn P, Demenberg M, Anderson J. Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma. *free radic. Biol. Med.* 1996,95:1301-08
19. Comhair S, Bhatena P, Dweik R, Kavuru M, Erzurum S. rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen induced asthmatic response. *Lancet* 2000,355:624-30
20. Kelly F, Tetley T. Nitrogen dioxide depletes uric acid and ascorbic acid but not glutathion from lung lining fluid. *Biochem J* 1997,325:95-9
21. De Raeve H, Thunnissen F, Kaneko F, Guo F, Lewis M, Kavuru M, Secic M, Erzurum S. decreased Cu,Zn-SOD activity in asthmatic airways epithelium: correction by inhaled corticosteroid in vivo. *Am J Physiol*,1997, 272, L148-54.
22. Rahman I, Antonicelli F, MacNee W. Molecular mechanisms of the regulation of glutathione synthesis by tumor necrosis factor α and dexametasona in human alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 1999,274, 5088-96.
23. Comhair S, Bhatena P, Farver C, Thunnissen F, Erzurum S. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *Faseb J*,2001,15,70-8.
24. Babior, BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N.engl.J.Med.* 1978, 298:659.
25. Someya, A, Nishijima, H, Nunoi, S, Irie, I, Nagaoka, Study on superoxide-producing enzyme of eosinophils and neutrophils comparison of NADPH oxidase components. *Arch. Biochem Biophys*,1997, 345:357.
26. Kelly F, Mudway I, Krishna M, Holgate S. The free radical basis of air pollution: focus on ozone. *Respir Med* 1995, 89,647-56.
27. Rautalahti, M, Virtano, J, Haukka, J, Huttunen et al. The effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on COPD symptoms. *Am J Resp Crit Care Med*,1997,144:7-52.
28. Ozaras, R, Taham V, Turkmen S, Talay F, Besirli K, Aydim S, Uzum H, Cetinkaya A. Changes in malondialdehyde levels in bronchoalveolar fluid and serum by the treatment of asthma with inhaled steroid and beta2 agonist. *Respirology* 2000 Sep; 5(3):289-92
29. Mota Pinto, A. Envelhecer Vivendo. *Das Teorias à Fisiopatologia*:13:29,2001.