

AVALIAÇÃO LABORATORIAL DOS PRODUTOS E SUB-PRODUTOS INDICATIVOS DA ELEVAÇÃO DE RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES ATIVADAS DE OXIGÊNIO

Paulo Cesar Naoum*
Claudia Regina B. Domingos**

RESUMO

Avaliação dos produtos e sub-produtos indicativos da elevação de radicais livres e espécies ativadas de oxigênio. A elevação dos radicais livres no interior das células surge quando há diminuição do estado reduzido, fato que promove gradualmente a oxidação dos produtos orgânicos, afetando as atividades das enzimas.

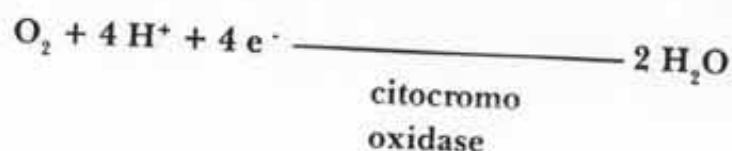
O corpo humano apresenta uma variedade de funções das quais participam diferentes órgãos e sistemas. Assim, as principais atividades orgânicas conhecidas por alimentação, metabolismo, respiração, excreção, circulação, movimentos, estrutura física, capacidade reativa, sensibilidade, coordenação, crescimento e reprodução dependem da ação integrada das células que compõem os diversos sistemas orgânicos.

Cada pessoa tem aproximadamente 200 bilhões de células, das quais 10% estão na circulação sanguínea e representadas pelos glóbulos vermelhos. Nas células, ocorrem constantes trocas de substâncias orgânicas e inorgânicas, especialmente representadas por proteínas, enzimas e sais minerais. Diante desse processo fisiológico, cada célula pode determinar suas próprias atividades bem como seu desenvolvimento bioquímico, procurando sempre o estabelecimento de um equilíbrio dinâmico, que na realidade também está na dependência das influências internas e externas das células.

Uma das mais importantes atividades biológicas das células é a manutenção de suas moléculas no estado reduzido, cuja etapa essencial consiste na redução do oxigênio (O_2) em água (H_2O). Para a execução desse processo, todo o oxigênio celular reage com hidrogênio e elétrons (também celulares) sob ação de uma enzima denominada citocromo oxidase conforme o esquema:

* Professor Titular da UNESP e Assessor da OMS.

** Doutora Titular da UNESP.



Entretanto, durante esse processo, ocorrem formações de moléculas ou átomos com um elétron desapareado - **os radicais livres** (também conhecidos por espécies ativadas de oxigênio). Os radicais livres são compostos por água oxigenada ou peróxido de oxigênio (H_2O_2), o ion superóxido (O_2^-) e o hidroxil (HO^\bullet), e que são metabolitos normais em células aeróbicas.

A elevação dos radicais livres no interior das células surge quando há diminuição do estado reduzido, fato que promove gradualmente a oxidação dos produtos orgânicos, afetando as atividades das enzimas. Além disso, os radicais livres interferem em reações bioquímicas, produzindo danos efetivos nas estruturas biológicas, notadamente nos ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas e lipídios.

Diversos pesquisadores têm proposto o envolvimento dos radicais livres no processo de envelhecimento e na morte precoce das células. A maioria dessas pesquisa foi baseada em situações em que o crescimento celular sob baixa tensão de oxigênio, ou em presença de vitaminas E aumentavam o tempo de vida em que as células humanas podem replicar. Esses resultados demonstraram também que os radicais livres podem ser tóxicos para diferentes componentes e estruturas celulares (por ex.: a hemoglobina do glóbulo vermelho), para o material genético (por ex.: quebra ou danos da estrutura do DNA), e para as membranas celulares (peroxidação da camada de lipídeos).

Fontes biológicas de radicais livres

Como já foi apresentado, os radicais livres podem ser produzidos pelas próprias células. Os principais locais de produção desses elementos são as membranas das mitocôndrias, que são fontes fisiológicas de H_2O_2 , o retículo endoplasmático que através da autooxidação do citocromo P-450 fornece O_2^- , e enzimas do citosol (xantina oxidase e aldeído oxidase) que contribuem para a produção H_2O_2 .

Por outro lado, a agregação tóxica externa proveniente de agentes oxidantes como nitritos, óxidos de enxofre e nitrogênio são fontes abrangentes de agressão celular que causam desequilíbrios bioquímicos com produção de radicais livres.

Regulação biológica de radicais livres

A proteção biológica contra os efeitos associados com níveis excessivos de O_2^- , H_2O_2 , e OH^\bullet tem sido atribuída a três enzimas: **superóxido dismutase (SOD)**, **catalase** e **glutathione (GSSH)**.

Essas enzimas, presentes em quase todas as células, são facilmente mensuradas nos glóbulos vermelhos. Embora presentes em baixas concentrações, essas enzimas são metabolitos normais em células aeróbicas, atuando com eficiência na redução do oxigênio. Por terem regulação genética, essas enzimas podem ter deficiência de produção em algumas pessoas, fato que propicia a elevação dos níveis de radicais

livres e conseqüentemente causam danos celulares. Por outro lado, quando sintetizadas normalmente, a geração de radicais livres nas células produzem aumento de síntese dessas enzimas até um máximo fisiológico, resultando como excelente parâmetro de avaliação.

Avaliação laboratorial dos radicais livres

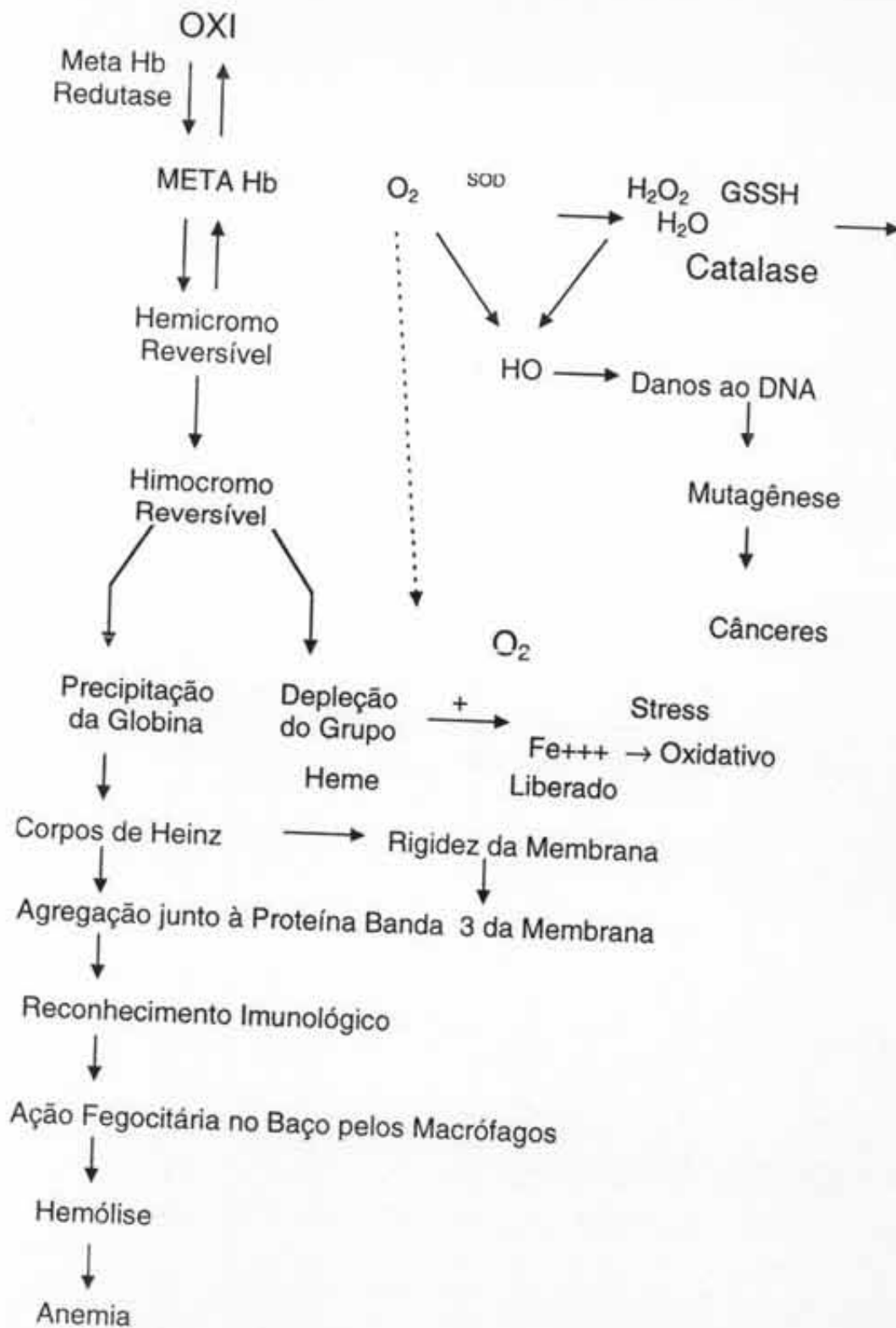
Entre os indicadores biológicos que apresentam elevada sensibilidade laboratorial para avaliar a ação deletéria dos radicais livres, destacam-se os glóbulos vermelhos. Essas células constituem, no conjunto, cerca de 10% do conteúdo celular de um indivíduo. Seu principal constituinte, a hemoglobina, quando afetada por agressões tóxicas oxidantes, produzem a elevação dos radicais livres. Em resposta, a célula reage com a ação redutora promovida por superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase, que sintetizadas por meio de regulação genética, apresentam elevação de seus níveis quantitativos. Quando o acúmulo desses radicais livres supera o controle exercido por essas enzimas redutoras, inicia-se o processo de lesão celular. Primeiramente, vários aminoácidos que compõem as proteínas celulares sofrem a ação oxidante e se decompõem, por ex. metionina, triptofano, histidina, tirosina e cisteína. Resultante desse processo, ocorre a peroxidação dos lipídeos, causando a fragmentação da membrana celular.

Diante desse processo, a avaliação da toxicidade dos glóbulos vermelhos pela ação dos radicais livres pode ser prevista com antecedência através da avaliação da metahemoglobina, sulfohemoglobina (ou hemicromos - produtos de desintegração) e corpos de Heinz.

Quando o glóbulo vermelho está sob ação oxidante, ocorre, inicialmente, a elevação dos níveis de metahemoglobina que mesmo discreta é indicativo da geração de radicais livres de íons superóxido. Para regular essa geração de O_2^- , a célula reage elevando a concentração de superóxido dismutase e glutathione redutase. Como produto da oxidação da hemoglobina resulta, portanto, a elevação de metahemoglobina, sulfohemoglobina e a presença dos corpos de Heinz no interior dos glóbulos vermelhos. A intensidade de presença de corpos de Heinz é diretamente proporcional ao grau de oxidação da hemoglobina. Por outro lado, como produto resultante de excesso de radicais livres, detectam-se o aumento da concentração de superóxido dismutase e glutathione redutase.

O desequilíbrio provocado pela oxidação celular, causada pelos radicais livres nos glóbulos vermelhos, provoca lesões celulares graves. Essas lesões podem atingir os precursores dessas células na medula óssea - os eritroblastos - provocando danos ao DNA. Em outros tipos celulares, os danos ao DNA podem gerar mutagênese e cânceres.

A figura a seguir representa a degradação das hemoglobinas com geração de radicais livres em processo de "stress" oxidativo celular.



Avaliação laboratorial da oxidação celular

Os glóbulos vermelhos apresentam três grandes vantagens sobre os demais tipos celulares para o estabelecimento da avaliação laboratorial causada pela geração de radicais livres, destacadas da seguinte forma:

1. facilidade de obtenção e isolamento dos glóbulos vermelhos, da hemoglobina e de suas sub-unidades, todas isentas de contaminações;
2. representa 10%, pelo menos, do conteúdo celular da espécie humana, e se caracteriza como excelente indicador biológico dos efeitos provocados pelo "stress" oxidativo nas células;
3. pelo seu processo natural e fisiológico estabelecido pela circulação sanguínea, os glóbulos vermelhos durante todo o seu ciclo vital entram em contato com as mais diversas estruturas orgânicas. Esse fato promove uma forma de detecção indireta de agressões tóxicas e oxidantes em diferentes órgãos e sistemas.

A avaliação laboratorial da oxidação celular pode ser efetuada de forma indireta e direta. Na forma indireta, determinam-se as concentrações de meta e sulfahemoglobina e a presença de corpos de Heinz. A avaliação direta da presença de radicais livres nos glóbulos vermelhos realiza-se por meio das dosagens de superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione redutase (GSSH).

De uma forma geral, sempre que há elevação de metahemoglobina e/ou de sulfahemoglobina, com ou sem presença de corpos de Heinz, ocorre elevação de concentração de superóxido dismutase e glutathione.

A presença de corpos de Heinz indica um estado avançado do processo, resultante da degradação da hemoglobina.

Diante do exposto, a avaliação da oxidação celular causada pela geração de radicais livres pode ser realizada em duas etapas:

1ª Etapa - Testes seletivos que indicam Oxidação Celular

- DOSAGEM DE METAHEMOGLOBINA
- DOSAGEM DE SULFOHEMOGLOBINA
- PESQ. CITOLÓGICA DE CORPOS DE HEINZ

2ª Etapa - Testes Específicos Indicativos da Reação Orgânica

Contra A

Oxidação Celular

- DOSAGEM DE SUPERÓXIDO DISMUTE
- DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUTASE

ABSTRACT

The authors analyze the evaluation of products and sub products indicant of the free radical elevation and species activated of oxygen. The elevation of the free radicals in the interior of the cells appear when there is a decrease in the reduced state, a fact that promotes gradually the oxidation, of organic products, affecting the enzyme's activities.

BIBLIOGRAFIA

- 1- COHEN, G. y HOCHSTEIN, P. Generation of hydrogen by haemolytic agents. **Biochemistry**, v. 3, 1964, p. 895-900.
- 2- DAS, D.K. y ESSMAN, W.B. **Oxygen radicals: systemic events and disease process**. Basel: Karger, 1990. 196 p.
- 3- MEDEIROS, M.H.G. et al. Oxygen toxicity and hemoglobinemia in subjects from a highly polluted town. **Arch. Environm. Health**, v. 38, 1983, p. 11-6.
- 4- NAOUM, P.C. **Diagnóstico das Hemoglobinopatias**. São Paulo: Sarvier, 1987. 245 p.
- 5- ROWLEY, D. A. y HALLIWELL, B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of thiol compounds. **Febs Letts.**, v.138, 1982, p. 33-6.
- 6- WINTERBOURN, C. C. Comparison of superoxide with other reducing agents into biological production of hydroxyl radicals. **Biochem J.**, v. 182, 1979, p. 625-8.
- 7- WINTERBOURN, C. C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Semin. Hematol.**, v. 27, 1990, p. 41-50.