



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLAÚDIA ROBERTA BRUNNQUELL

**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO NA DOENÇA
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA EXPERIMENTAL**

Londrina
2010

CLAÚDIA ROBERTA BRUNNQUELL

**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO NA DOENÇA
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini

Londrina
2010

CLAÚDIA ROBERTA BRUNNQUELL

**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO NA DOENÇA PULMONAR
OBSTRUTIVA CRÔNICA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni
UEM – Maringá – PR

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Rubens Cecchini
UEL – Londrina – PR

Londrina, 29 de janeiro de 2010

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rubens Cecchini pela imprescindível orientação, instrução e conhecimento durante este trabalho.

A Profa. e amiga Flávia Alessandra Guarnier pela disponibilidade, atenção; paciência e contribuição essencial na realização deste trabalho e na minha formação científica.

Aos meus pais, Osni e Miriam, que sempre me apoiaram e possibilitaram que eu alcançasse este objetivo e sem os quais não teria êxito.

As minhas irmãs, Katerine e Claudine, que sempre acreditaram em mim.

Ao meu marido, Felipe Szczepanski, pela paciência, companheirismo e amor. Este trabalho não seria realizado se não fosse você.

Aos amigos e técnicos Jesus Antonio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho pela disponibilidade e ajuda nos experimentos e apoio e alegria nos momentos difíceis.

Aos amigos da pós-graduação por todo o companheirismo.

Ao corpo docente do Mestrado em Patologia Experimental sem os quais não conseguiria cumprir este trabalho.

Aos amigos do laboratório que sempre me apoiaram.

As secretárias Ana Maria Rodrigues e Vânia Darc de Castro pela disponibilidade.

BRUNNQUELL, Cláudia Roberta. **Estresse oxidativo sistêmico na doença pulmonar obstrutiva crônica experimental**. 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma condição progressiva e lenta com efeitos pulmonares relacionados à ativação de células inflamatórias e estresse oxidativo. Porém, estudos recentes mostram que a DPOC não está associada somente as anormalidades do parênquima pulmonar, mas também ao estresse oxidativo sistêmico, que contribuiria para as alterações sistêmicas na função bioquímica e de órgãos. Este estudo tem como objetivo avaliar a correlação do estresse oxidativo sistêmico, com a perda de massa muscular, em ratos com enfisema pulmonar induzido experimentalmente, após 20 dias da instilação intratraqueal de papaína. Foram utilizados 19 ratos Wistar machos (240-300g) distribuídos em dois grupos: Grupo enfisema (GE) – 9 animais submetidos à instilação intratraqueal de papaína (100 µl, 20 mg/ml, em NaCl 0,9%); Grupo controle (GC) – 10 animais submetidos à instilação intratraqueal de NaCl 0,9%. Após 20 dias da indução, os animais experimentais e controle foram pesados, e, a coleta de sangue, por punção cardíaca, foi realizada para determinação da lipoperoxidação por quimiluminescência (QL), capacidade antioxidante total (TRAP), proteínas carboniladas, glutatona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e pressões parciais de oxigênio e gás carbônico. Após 20 dias da indução, os animais experimentais e controle foram sacrificados por decapitação. O lobo médio do pulmão direito foi retirado para análise histológica e quantificação do enfisema pulmonar. O gastrocnêmio foi retirado e pesado para a determinação da relação da massa muscular com a massa corporal total e análise histológica. Na quantificação do enfisema pulmonar observou-se um número de interceptos das estruturas alveolares com o sistema de retas significativamente menores ($p < 0,05$) no GE ($48,37 \pm 2,7$) em relação ao GC ($54,49 \pm 1,6$). As análises histológicas do pulmão do GE mostraram aumento dos espaços alveolares, com paredes alveolares delgadas e destruição de septos alveolares e de capilares em relação ao GC. O GE mostrou índice de caquexia de $6,28 \pm 0,91\%$ com diminuição significativa ($p < 0,05$) da relação da massa muscular com a massa corporal total, sendo a média do GC $0,0038 \pm 0,0002$ e $0,0030 \pm 0,0002$ do GE. A lipoperoxidação de hemácias do GE apresentou-se aumentada significativamente ($p < 0,001$) em relação ao GC, com média de 14466 ± 877 e 6885 ± 1049 , respectivamente. A carbonilação de proteínas no plasma apresentou-se aumentada significativamente ($p < 0,001$) no GE em relação ao GC, com média de $0,034 \pm 0,0002$ e $0,024 \pm 0,0001$, respectivamente. A capacidade antioxidante total e a quantificação de GSH não mostrou diferenças significantes. Observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração da SOD no GE, com média de $11,26 \pm 2,23$ e $4,72 \pm 0,68$ e da atividade da CAT ($p < 0,01$), com média de $1,06 \pm 0,11$ e $0,45 \pm 0,02$. A média da pressão parcial de oxigênio e gás carbônico não apresentaram diferenças significantes. Estes resultados revelam aumento da lipoperoxidação das hemácias, da concentração da SOD, carbonilação protéica e atividade da catalase, acompanhado por perda de massa corporal e muscular. Este estudo apresenta evidências experimentais de estresse oxidativo sistêmico na DPOC, sugerindo sua participação na perda de massa corporal e muscular.

Palavras-chave: DPOC. Estresse oxidativo sistêmico. Massa corporal. Massa muscular.

BRUNNQUELL, Cláudia Roberta. **Systemic oxidative stress in the chronic obstructive pulmonary disease**. 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a slowly and progressive condition and pulmonary effects with activation of inflammatory cells and oxidative stress. However, recent studies show that COPD is associated with systemic oxidative stress, which contribute to systemic changes in biochemical function and organ. This study aims to correlate the systemic oxidative stress related with wasting muscle mass in experimental emphysema rats, 20 days after intratracheal instillation of papain. It was used 19 male Wistar rats (180-250g) divided into two groups: Emphysema Group (EG) - 9 animals with intratracheal instillation of papain (100 μ l, 20 mg / ml in NaCl 0.9%). Control Group (CG) - 10 animals treated with intratracheal instillation of NaCl 0.9%. After 20 days of induction, the experimental and control animals were weighed, and blood collection by cardiac puncture was performed to determine the lipoperoxidation, total antioxidant defenses, protein carbonyl, reduced glutathione, superoxide dismutase and catalase. On 20th day, the experimental and control animals were killed by decapitation. Middle lobe of right lung was removed for histological analysis and quantification of pulmonary emphysema. Gastrocnemius muscle was removed and weighed to determine the ratio of muscle mass to total body mass and histological analysis. On pulmonary emphysema was observed a number of intercepts of alveolar structures with the system straight significantly lower ($p < 0.05$) in EG ($48,37 \pm 2,7$) than in CG ($54,49 \pm 1,6$). Histological analysis of EG showed increased alveolar spaces, with thin alveolar walls and septum and alveolar destruction. EG showed cachexia index of $6,28 \pm 0,91\%$ with significant reduction ($p < 0,05$) in the ratio of muscle mass to total body mass, with average CG $0,0038 \pm 0,0002$ and $0,0030 \pm 0,0002$ EG. Erythrocytes lipid peroxidation of GE increased significantly ($p < 0.001$) compared to GC, with average $14,466 \pm 877$ and 6885 ± 1049 , respectively. Proteins carbonylation of plasma was significantly ($p < 0.001$) increased in GE, with average 0.034 ± 0.024 and 0.0002 ± 0.0001 , respectively. Total antioxidant capacity and quantification of GSH showed no significant differences. EG showed a significant increase ($p < 0.05$) of SOD concentration, with average 11.26 ± 2.23 and 4.72 ± 0.68 and CAT activity ($p < 0.01$), with average $1,06 \pm 0.11$ and 0.45 ± 0.02 . The average partial pressure of oxygen and carbon dioxide showed no significant differences. These results show increased lipid peroxidation of red blood cells, concentration of SOD, protein carbonylation and catalase activity, accompanied by wasting mass and muscle mass. This study presents experimental evidence of systemic oxidative stress in the COPD and suggests its participation in wasting body mass and muscle mass.

Keywords: COPD. Systemic oxidative stress. Body mass. Muscle mass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de obstrução das vias aéreas	11
Figura 2 – Enfisema centroacinoso e panacinoso.....	13
Figura 3 – Funções das espécies reativas de oxigênio na lesão celular.....	16
Figura 4 – Fisiopatologia das manifestações sistêmicas e locais da DPOC.....	17
Figura 5 – Mecanismos da perda de peso em pacientes com DPOC	20
Figura 6 – Emissão de fótons na TRAP pelo tempo de reação em minutos	27
Figura 7 – Quantificação do número de interceptos cruzados	31
Figura 8 – Análise histológica do enfisema pulmonar	32
Figura 9 – Relação entre a massa muscular e a massa corpórea	33
Figura 10 – Análise histológica do gastrocnêmio	34
Figura 11 – QL de hemácias mostrando a média da área da concentração de lipoperóxidos	35
Figura 12 – Curvas representativas do estresse oxidativo nas hemácias.....	36
Figura 13 – Capacidade antioxidante total do plasma (TRAP).....	37
Figura 14 – Concentração de proteínas carboniladas no plasma.....	38
Figura 15 – Concentração de SOD e GSH e atividade da catalase no hemolisado de hemácias	39
Figura 16 – Pressões de O ₂ e CO ₂ no sangue venoso	40

LISTA DE SIGLAS

ABAP	2,2-azo-bis 2-amidinopropano diidrocloreto
AIDS	síndrome de imunodeficiência adquirida
ATP	adenosina trifosfato
AMP	adenosina monofosfato
Ca⁺²	íon cálcio
CAT	catalase
CO₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ERNs	espécies reativas do nitrogênio
EROs	espécies reativas do oxigênio
Fe²⁺	íon ferroso
Fe³⁺	íon férrico
GLUT-4	transportador de glicose 4
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
H	ânion hidrogênio
HIF-2	fator induzível pela hipóxia 2
HSP	proteína de choque térmico
H₂O	água
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
KCl	cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
MDA	malonaldeído
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
N₂	nitrogênio molecular
NO	óxido nítrico

O₂	ânion superóxido
O₂	oxigênio
OH	radical hidroxil
PO₂	pressão parcial de oxigênio
PCO₂	pressão parcial de gás carbônico
pH	potencial hidrogeniônico
SOD	superóxido dismutase
<i>t</i>-BOOH	t-butil hidroperóxido
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TRAP	capacidade antioxidante total
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA E ESTRESSE OXIDATIVO PULMONAR	13
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO	17
1.3	DPOC E PERDA DE MASSA MUSCULAR	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	GERAL	22
2.2	ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	ANIMAIS	23
3.2	REAGENTES	23
3.3	INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA DPOC	24
3.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO ENFISEMA PULMONAR	25
3.5	OBTENÇÃO E PREPARO DO SANGUE	25
3.6	AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO	26
3.7	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP) DO PLASMA	26
3.8	DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS CARBONILADAS	28
3.9	QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	28
3.10	QUANTIFICAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	28
3.11	ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)	29
3.12	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	29
3.13	QUANTIFICAÇÃO DA PO ₂ E PCO ₂	30
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4	RESULTADOS	31
4.1	QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE INTERCEPTOS CRUZADOS	31
4.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO ENFISEMA PULMONAR	31
4.3	DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA MUSCULAR	32

4.4	DETERMINAÇÃO DA MASSA DO GASTROCNÊMIO EM RELAÇÃO À MASSA CORPORAL TOTAL	32
4.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO GASTROCNÊMIO	33
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS DE HEMÁCIAS	34
4.7	CURVAS REPRESENTATIVAS DA QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR TERT-BUTIL	35
4.8	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA	36
4.9	DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS CARBONILIDAS NO PLASMA	37
4.10	DETERMINAÇÃO DA SOD, CAT, GSH	38
4.11	QUANTIFICAÇÃO DA PO ₂ E PCO ₂	39
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma condição progressiva e lenta, caracterizada pela limitação irreversível do fluxo aéreo com estreitamento das pequenas vias aéreas, bronquiolite e destruição do parênquima pulmonar (LARSSON, 2007; MACNEE, 2005), sendo a maior causa de mortalidade e morbidade crônica no mundo (RABE et al., 2007). A Organização Mundial de Saúde prediz que esta será a terceira maior causa geral de incapacitação e quinta de morte até 2020 (AGUSTÍ, 2005). No Brasil é responsável por cerca de 30 mil óbitos/ano, com, atualmente, três milhões de portadores da doença, sendo que sua progressão é alarmante mundialmente, com números crescentes (PAUWELS et al., 2001).

A denominação DPOC engloba uma série de doenças de diferentes etiologias, mas sempre associadas a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e/ou a gases irritantes. Dentre os pacientes com DPOC, aproximadamente 20% apresentam enfisema, enquanto os outros 80% têm bronquite crônica ou, ainda, uma combinação destas duas afecções (MONTEIRO, 2004). A obstrução das vias aéreas está associada aos mecanismos responsáveis pelo bloqueio da luz brônquica (Figura 1).

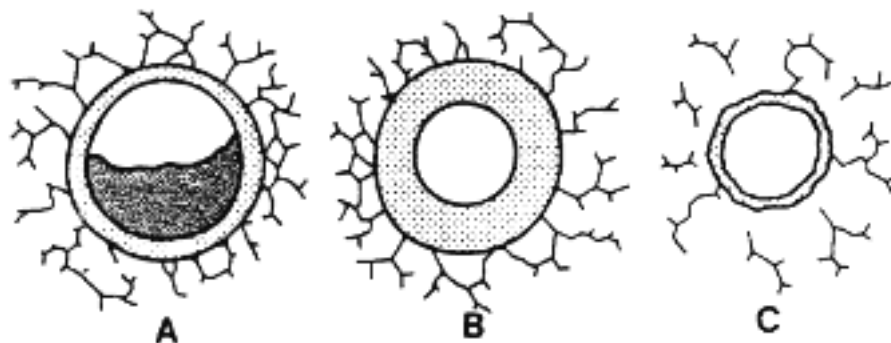


Figura 1 – Mecanismos de obstrução das vias aéreas.

(A) A luz está parcialmente bloqueada, por exemplo, por secreções excessivas. (B) A parede das vias aéreas está espessada, por exemplo, por edema ou hipertrofia muscular, (C) A anormalidade é fora das vias aéreas; neste exemplo, o parênquima pulmonar está parcialmente destruído e a via aérea estreitou-se em virtude da perda de tração radial.
Fonte: West, 1996.

A DPOC é o resultado da interação entre fatores genéticos e diferentes estímulos ambientais, que incluem o tabagismo e a queima de biomassa. As exposições a poluentes ambientais e profissionais, fatores genéticos, hiper-responsividade das vias aéreas, determinados eventos perinatais e doenças da infância, infecções broncopulmonares recorrentes e fatores dietéticos também são fatores de risco para a DPOC (FLETCHER et al, 1977; GOLD et al., 1996; CHENG et al., 2004).

Segundo Filho (2006), a teoria mais aceita para a patogênese do enfisema é o mecanismo protease-antiprotease, segundo o qual o enfisema resulta do desbalanço entre proteases e antiproteases, com predomínio da ação das proteases e conseqüente destruição dos septos alveolares.

A α_1 -antitripsina é uma antiprotease que reveste o epitélio respiratório e possui grande atividade antielastase no parênquima pulmonar. Portanto, a sua deficiência, por inativação por oxidantes ou homozigose para o gene Z, pode levar ao enfisema pulmonar (WEST, 1996; PALOMBINI *et al.*, 2001; FILHO, 2006).

De acordo com Snider (1986) e Palombini (2001), o enfisema pode ser definido de acordo com o acometimento da anatomia dos ácinos pulmonares, indicando a etiologia e o comportamento fisiopatológico da apresentação da doença. O enfisema panacinar apresenta o ácino pulmonar comprometido por um alargamento difuso, habitualmente estendendo-se desde a região hilar até a periferia dos pulmões, com perda das paredes alveolares e destruição de parte do leito capilar. Esse enfisema é encontrado em indivíduos com deficiência de α_1 -antitripsina e em modelo experimental, com o uso de enzimas proteolíticas, como a papaína (Figura 2).

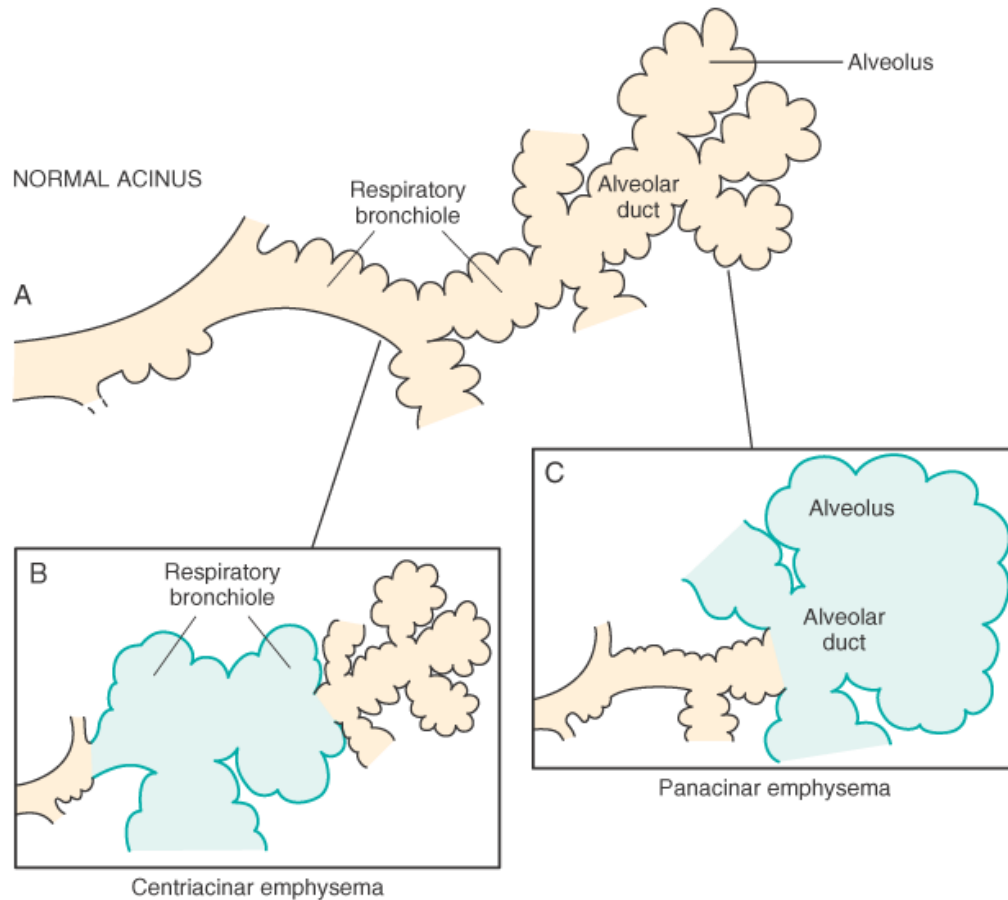


Figura 2 – Enfisema centroacinoso e panacinoso.

Observar que no enfisema centroacinoso, a destruição é limitada aos bronquíolos terminais e respiratórios. No enfisema panacinoso os alvéolos periféricos também são comprometidos.

Fonte: Fausto *et al.*, 2005.

1.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA E ESTRESSE OXIDATIVO PULMONAR

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) participam ativamente, tanto de uma série de processos biológicos normais (crescimento celular, morte celular programada e senescência) (FINKEL, 2003), como de diversos processos patológicos (lesões mitocondriais, peroxidação de membranas biológicas e lesão do DNA celular) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Define-se como Espécie Reativa de Oxigênio (ERO) ou Nitrogênio (ERN) qualquer espécie derivada de oxigênio (O_2) ou nitrogênio (N_2) que tenha um elétron desemparelhado na última camada de valência, o que a torna muito reativa a qualquer molécula de lipídeo, proteína e ácido nucléico (FILHO, 2006).

As células possuem sistemas antioxidantes que impedem o efeito deletério dos radicais livres. A superóxido dismutase (SOD) constitui um mecanismo rápido de resposta a formação do radical superóxido e está presente em todos os organismos eucarióticos, sendo responsável por catalisar a dismutação de dois radicais superóxidos em O_2 e H_2O_2 (VALKO et al., 2006).

A catalase (CAT) é uma hemoproteína contendo quatro grupos heme que tem especificidade para o H_2O_2 , produzido na dismutação do O_2^- pelas SODs, decompondo-o cataliticamente em um tempo extremamente rápido. Quando o peróxido se encontra em altas concentrações a catalase age principalmente catalisando a transformação do H_2O_2 em H_2O e O_2 (VALKO et al., 2006).

A glutathiona reduzida (GSH), um antioxidante não enzimático, é um tiol tripeptídeo de baixo peso molecular encontrado abundantemente no meio intracelular. Esta molécula possui grande importância em diversos processos intracelulares como, por exemplo, transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, modulação da atividade enzimática, metabolismo de xenobióticos, e proteção contra substâncias carcinogênicas e EROs (SIES et al., 1979; ANDERSON; MEISTER, 1983; DOUGLAS, 1987; MEISTER, 1988).

Além da GSH, outros antioxidantes não enzimáticos, tais como vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou provenientes de fontes exógenas, impedindo o ataque sobre fosfolídeos, aminoácidos das proteínas, dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A capacidade antioxidante total (TRAP) revela a defesa de antioxidantes de baixo peso molecular, não enzimáticos (PRIOR; CAO, 1999; LIU et al., 2003).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes, ocasionado pela diminuição de defesas antioxidantes e/ou a geração de mais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O estresse oxidativo pode resultar em lesões (FILHO, 2006).

O estresse oxidativo e o processo inflamatório têm sido considerados um dos principais responsáveis pela progressão contínua e irreversível da DPOC com participação ativa de macrófagos, neutrófilos e linfócitos CD8 associada a estímulos oxidantes diretos das estruturas pulmonares, que desencadeiam reações bioquímicas, levando a progressiva desorganização das pequenas vias aéreas e ao remodelamento estrutural não reversível. A liberação de substâncias provenientes das células recrutadas e do estresse

oxidativo leva ao desequilíbrio, inicialmente temporário, dos mecanismos de defesa pulmonar e, posteriormente, à permanência deste desequilíbrio (ALMEIDA, 2001).

O enfisema pulmonar pode ser causado pela destruição de fibras elásticas do interstício do pulmão por elastases. Em 1963, foi descrito cinco pacientes com deficiência de α_1 -antitripsina, a principal substância responsável pela inibição da elastase neutrofílica; três destes pacientes tinham enfisema (LAURELL et al., 1963). Em 1965, um grupo de autores instilaram papaína pela traquéia no pulmão de roedores, numa tentativa de produzir granulomas e acabaram descobrindo que esta substância provocava enfisema (GROSS et al., 1965).

As enzimas proteolíticas como elastases e papaína podem levar à destruição do parênquima pulmonar. Modelos experimentais de enfisema pulmonar, com administração destas enzimas, têm sido utilizados (FUSCO, 2002). A papaína é reconhecida por apresentar uma potente atividade elastolítica, degradando não apenas a elastina, como também o colágeno dos tecidos (TURINO et al., 2002). A destruição do parênquima pulmonar tem início com a agressão provocada pela papaína, com alterações da arquitetura pulmonar, progredindo até estabilizar-se em algumas semanas (MATORANA et al., 1982; MONTEIRO et al., 2004).

Dados da literatura demonstram que o modelo por instilação endotraqueal de elastase, uma enzima elastina-específica, pode acelerar o processo de degradação dos septos interalveolares e promover o estabelecimento sintomático da doença (CANTOR et al., 2000). Porém, estudos prévios do nosso laboratório estabeleceram um modelo experimental de enfisema por papaína, capaz de reproduzir as mesmas características.

O tecido pulmonar, agredido pela papaína, sofre modificações no metabolismo e induz as células ou a matriz extracelular a liberar mediadores como quimiocinas, interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- α) e derivados lipídicos (FILHO, 2006). Estas citocinas, especialmente o TNF- α , participam de forma importante na indução do estresse oxidativo com aumento da produção de EROs pelas mitocôndrias com alterações do sistema de transporte de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O oxigênio é a principal fonte de radicais livres nas células, pois, durante as fases intermediárias, de aceitação de elétrons, forma-se ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH). Sob situações fisiológicas eles não saem da mitocôndria e são neutralizados pelo sistema antioxidante, já em situações patológicas causam

lesão (FILHO et al., 2006) (Figura 3). Em indivíduos com DPOC, a carga oxidante nos pulmões está aumentada (NADEEM et al., 2005).

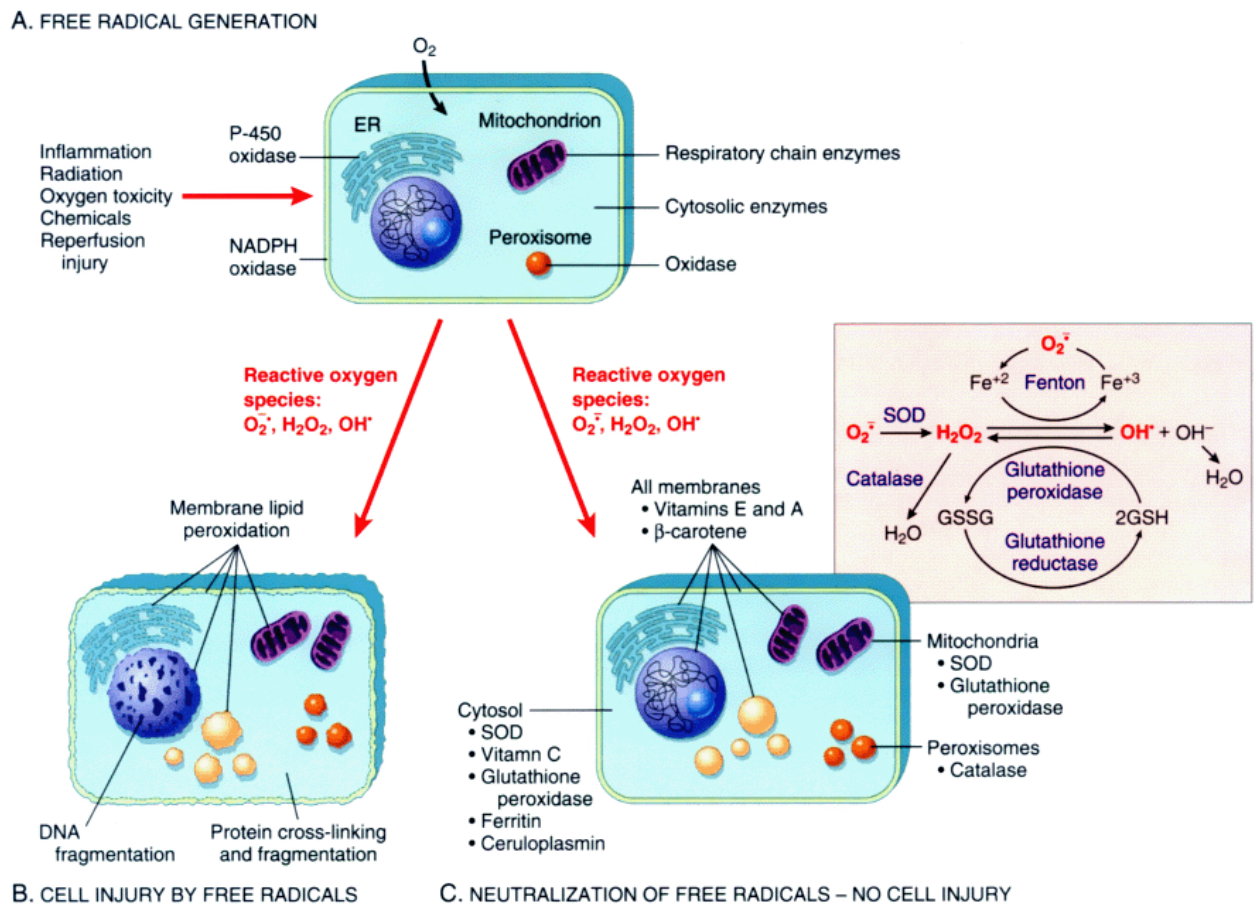


Figura 3 – Funções das espécies reativas de oxigênio na lesão celular
Fonte: Fausto et al., (2005)

Com a evolução da DPOC e a destruição do parênquima pulmonar ocorrem alterações nas trocas de gases entre os capilares pulmonares e alvéolos. Estabelece-se hipecapnia (aumento de CO_2 no sangue) e hipoxemia (diminuição de O_2 no sangue) (PALOMBINI et al., 2001). Com a privação de oxigênio, as células degeneram, morrem ou sofrem modificações metabólicas progressivas que originam respostas adaptativas sistemicamente (FILHO, 2006).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO

As agressões localizadas podem provocar respostas sistêmicas que consistem em reações inespecíficas, complexas e inter-relacionadas para a adaptação de um organismo frente à lesão (FILHO, 2006).

Estudos recentes mostram que a DPOC não está associada somente as anormalidades do parênquima pulmonar (PAUWELS et al., 2001), mas também a ativação de células inflamatórias na circulação e estresse oxidativo sistêmico (AGUSTÍ, 2001), que podem levar a alterações em outros órgãos (WOUTERS et al., 2002) (Figura 4).

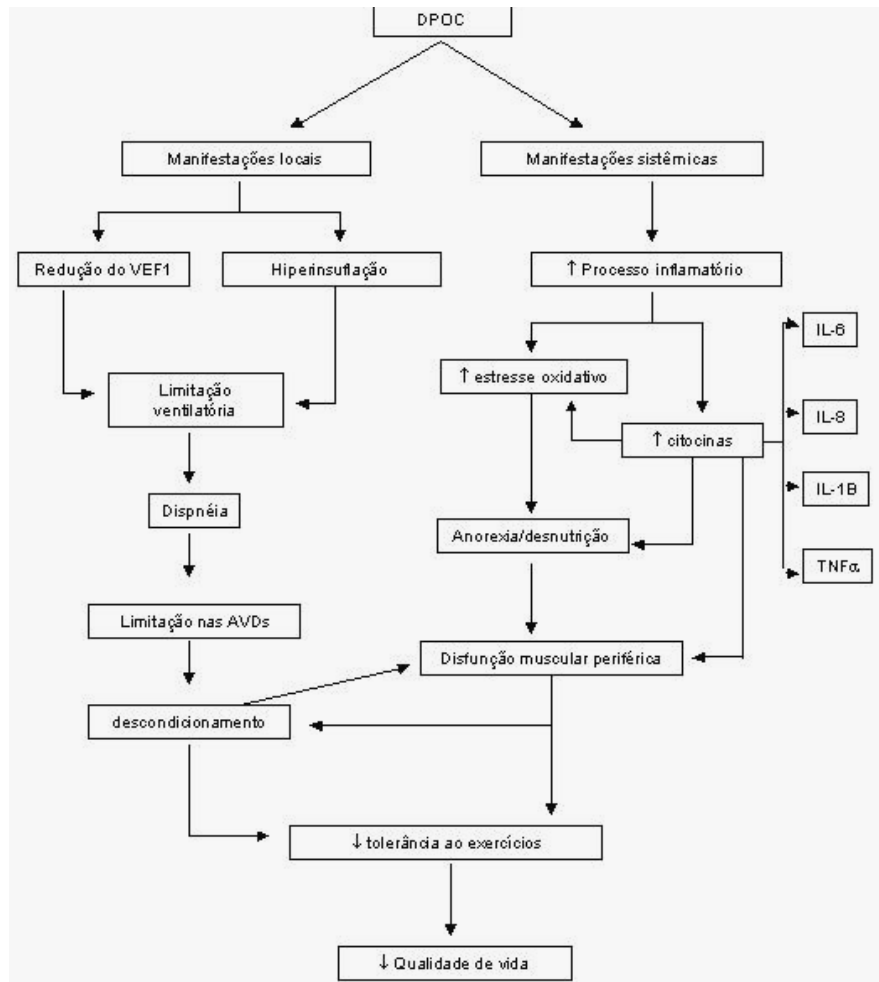


Figura 4 – Fisiopatologia das manifestações sistêmicas e locais da DPOC

VEF1: volume expiratório forçado no primeiro segundo; AVDs: atividades de vida diária; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8 IL-1B: interleucina 1B; TNF- α : fator de necrose tumoral α .
Fonte: Dourado et al., (2006)

O estresse oxidativo representa a chave para o mecanismo patológico da DPOC (REPINE et al., 1997). Alguns estudos têm demonstrado uma diminuição da capacidade antioxidante do plasma, enquanto outros demonstram o inverso (MAK, 2008). Também pode-se observar produtos de peroxidação lipídica no ar exalado de pacientes com DPOC (TSUKAGOSHI et al., 2000; MONTUSCHI et al., 2000).

Em pacientes com este tipo de acometimento, mediadores da inflamação podem ser detectados no soro, que se encontram aumentados durante a exacerbação da doença. Portanto, além das alterações que ocorrem nos pulmões, vários órgãos e estruturas sofrem o impacto dessas alterações, como o diafragma, o corpo carotídeo, e coração (MONTEIRO, 2004). Níveis circulantes elevados do TNF α , interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), proteína C reativa (uma proteína de fase aguda induzida sistemicamente por IL-6), têm sido descritos (GAN et al., 2004).

Em seu estudo, Joppa e colaboradores (2007) demonstraram que há um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes na DPOC, comprovada pelo aumento de malonaldeído (MDA) no soro e diminuição da atividade da glutathione peroxidase (GPx) nos eritrócitos. Já Pinho e colaboradores (2007) mostraram que há um aumento do estresse oxidativo sistêmico na DPOC com diminuição da capacidade antioxidante total (TRAP) e aumento dos níveis de MDA. Nadeem e colaboradores (2005) mostraram diminuição da atividade da GPx, SOD e catalase nos eritrócitos e aumento de MDA e proteína carbonílica no plasma na DPOC. Calikoglu e colaboradores (2002) demonstraram um aumento de MDA no soro e diminuição da GSH nos eritrócitos na DPOC.

A integridade das hemácias reflete o grau das alterações sistêmicas ocorridas em um organismo. A peroxidação da membrana das hemácias causa a perda da habilidade da hemácia de alterar sua forma (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). As membranas destas células apresentam altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, O₂, íons ferrosos no estado ligante e canais iônicos. O O₂ pode atravessar facilmente as membranas, tornando a hemácia susceptível à oxidação e, conseqüentemente, a ação de radicais livres, podendo levar ao estresse oxidativo. Assim, o estresse oxidativo sistêmico pode levar a lesões nas membranas das hemácias (ZOU et al., 2001).

A energia celular da hemácia provém da via glicolítica anaeróbica e de três vias auxiliares que servem para manter a função da hemoglobina de transportar o O₂. Todos estes processos são essenciais, uma vez que a hemácia deve transportar oxigênio e manter as características físicas necessárias para a sua sobrevivência na circulação. Aproximadamente 90 % da adenosina trifosfato (ATP) necessária para as hemácias são gerados na glicólise, a

principal via metabólica do eritrócito e 10% do ATP da hemácia são oriundos da via pentose-fosfato (MURRAY, 1994; LEHNINGER, 1995; STRYER, 1998).

A via da meta-hemoglobina-redutase constitui outro importante componente do metabolismo do eritrócito. Dois sistemas de meta-hemoglobina-redutase são importantes na manutenção da hemoglobina em um estado funcional reduzido. Esta via é necessária para manter o ferro do radical heme da hemoglobina no estado funcional ferroso (Fe^{2+}). Na ausência da ação enzimática, ocorre o surgimento da meta-hemoglobina, que resulta da oxidação do íon ferroso em férrico (Fe^{3+}). A meta-hemoglobina representa uma forma não-funcional de hemoglobina e uma perda da capacidade de transporte de oxigênio, visto que a porção meta-hemoglobina não pode ser combinada ao oxigênio. Em indivíduos saudáveis, não há mais que 1% de meta-hemoglobina nas hemácias. Isso garante a função e a sobrevivência das hemácias (MURRAY, 1994; STRYER, 1998).

A principal função da hemoglobina é o transporte gasoso, liberação e distribuição de oxigênio para os tecidos e facilidade de excreção de gás carbônico. A perda da viabilidade das hemácias está associada com várias alterações bioquímicas, que incluem o aumento do pH, aumento do teor de ácido lático, diminuição no consumo de glicose, redução nos níveis de ATP e uma perda da função da hemácia. Esta perda funcional, decorrente da lipoperoxidação da hemácia, via estresse oxidativo, pode levar a diminuição do aporte de oxigênio tecidual e contribuir para as alterações sistêmicas (MURRAY, 1994; STRYER, 1998; FILHO, 2006).

Entre os efeitos extrapulmonares da DPOC encontram-se as anormalidades nutricionais com perda de peso, disfunções musculares com perda de massa, e, efeitos cardiovasculares, nervosos e da gordura marrom (AGUSTÍ et al., 2003; AGUSTÍ et al., 2005).

1.3 DPOC E PERDA DE MASSA MUSCULAR

A perda de massa muscular é observada em muitos pacientes com DPOC e pode estar associada a diversos mecanismos (Figura 5). Esta perda afeta a capacidade física pela redução do desempenho no exercício e aumento dos sintomas, como dispnéia e fadiga, levando a perda progressiva de massa muscular e caquexia (ENGELLEN et al., 2000).



Figura 5 – Mecanismos da perda de peso em pacientes com DPOC
Fonte: Dourado et al., (2006)

A caquexia é uma síndrome associada à perda de massa celular, reduzida ingestão de alimento, diminuição de atividade física e acelerada degradação de proteínas (LANGSTEIN; NORTON, 1991; WALSMITH; ROUBENOFF, 2002). Pode ser decorrente de câncer, falência cardíaca congestiva, DPOC, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), diabetes, entre outras doenças (DELANO; MOLDAWER, 2006). Conforme Argilés (2005) a caquexia caracteriza-se pela perda de 10% da massa corporal dentro de 6 meses ou 5% em 1 mês.

Podem ser identificadas três fases da caquexia: caquexia leve, moderada e grave. A caquexia grave é facilmente caracterizada por perda de peso irreversível, perda muscular, anorexia, saciedade precoce, funções físicas reduzidas, fadiga, anemia e edema. Apesar da inespecificidade dos sintomas nos primeiros estágios da caquexia, ela deve ser diferenciada da perda de peso que ocorre devido a pouca ingestão calórica. Assim, a perda de peso serve como marcador do processo caquético. Entretanto, a verificação de anormalidades na perda de energia em repouso, que constitui uma parte específica da demanda energética do organismo, tem sido sugerida como possível marcador precoce, uma vez que inicia antes da perda de peso. Desta forma, faz-se necessário o aprimoramento e uso de marcadores precoces desta síndrome para que a intervenção terapêutica seja iniciada antes da detecção da perda de peso (SKIPWORTH et al., 2006).

Os radicais livres tornam-se agentes agressores às macromoléculas necessárias para as funções vitais. As alterações morfológicas celulares surgem pela modificação na estrutura das membranas, no citoesqueleto e outros componentes. Os agentes lesivos podem atuar diretamente na célula alvo, via estresse oxidativo, ou reduzir o fluxo sanguíneo com conseqüente diminuição do fornecimento de oxigênio para as células e produção de energia ou inibir enzimas da cadeia respiratória, diminuindo a produção de ATP. Em ambas as situações há interferência nas bombas eletrolíticas e síntese celulares, levando a alterações estruturais (FAUSTO et al., 2005; FILHO, 2006; RUBIN, 2006).

As citocinas pró-inflamatórias e o aumento das EROS podem causar uma modificação estrutural de proteínas, com catabolização e inativação protéica. O estresse oxidativo moderado pode aumentar a degradação de proteínas no músculo esquelético, causando aumento na expressão da maioria dos componentes da via ubiquitina-proteossoma (ENGELLEN et al., 2000; RABINOVICH et al., 2001; GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002). Os produtos formados no processo inflamatório como TNF- α , IL-1 e H₂O₂ ativam NF κ B pela degradação do inibidor I κ B, estimulando o processamento proteolítico proteassomal (SEM et al., 2000).

Com a progressão da doença há redução da atividade contrátil do músculo que influencia o trofismo e o balanço entre síntese e degradação musculares. Como conseqüência do desuso e da imobilização prolongados, há predomínio de perda de fibras de contração lenta. Além da redistribuição de fibras musculares, há evidências de que o diâmetro das fibras de contração lenta e de contração rápida está significativamente reduzido (WHITTOM et al., 1998; JAGOE et al., 2003).

Estudos realizados em biópsias do músculo vasto lateral mostraram redução significativa de enzimas oxidativas e manutenção, ou aumento de enzimas glicolíticas. Na DPOC também há redução do metabolismo de fosfocreatina muscular, um dos principais fatores envolvidos no metabolismo anaeróbio aláctico (MALTAIS et al., 1996; MALTAIS et al., 2000; POWERS et al., 2000; ALLAIRE et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a correlação do estresse oxidativo sistêmico com a perda de massa muscular, em ratos com enfisema pulmonar induzido experimentalmente, após 20 dias da instilação intratraqueal de papaína.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar os sistemas antioxidantes no sangue dos animais controle e com enfisema pulmonar na DPOC;
- Avaliar a lesão oxidativa de eritrócitos através de metodologia sensível e específica na DPOC;
- Avaliar a possível relação entre o estresse oxidativo sistêmico e a perda de massa muscular no modelo de DPOC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos (240-300g) fornecidos pelo biotério central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com dimensões de 16x34x40 cm sob o ciclo de luz de 12 horas e temperatura de 22°C ±1 no biotério do Departamento de Ciências Patológicas da mesma instituição. Foram alimentados *ad libitum* com água e alimento completo para ratos (Nuvilab CR1, Nuvital®, Colombo-PR, Brasil) até o sacrifício. Todos os animais foram cuidadosamente mantidos de acordo com as recomendações éticas de experimentação animal. Este projeto encontra-se aprovado pelo comitê de ética e registrado sob o número 05865, processo de número 34261/2008 na Universidade Estadual de Londrina.

3.2 REAGENTES

Foram utilizados os seguintes reagentes com as respectivas procedências: Éter etílico (FMaia); Heparin® (heparina sódica 5000 UI/ml, Cristália); Cloreto de sódio (Reagen Quimibrás); Fosfato de potássio monobásico (Reagen Quimibrás); tert-butil hidroperóxido (Acros); Peróxido de Hidrogênio (FMaia); Soro Albumina Bovina (SAB, Merck); solução cúprica (Merck); Reativo de Folin-Ciocalteau (Laborclin); TRIS (Biotec); Pirogalol (Sigma); Glicina (Sigma); 2,2-azo-bis (Sigma); Luminol (Sigma); Trolóx (Sigma); EDTA (GIBCOBRL); TCA (Acros); DTNB (Sigma); metanol (Merk); Glutathione (Sigma); Dinitrofenilhidrazina (DNPH, Sigma); Ácido clorídrico (Nuclear), Etanol (Nuclear); Guanidina (Sigma).

3.3 INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA DPOC

Foi empregado um modelo de indução do enfisema pulmonar por instilação intratraqueal de papaína numa concentração de 20 mg/ml, em uma administração de 100 µl (CANTOR et al, 2000; NIU et al., 2002). Os animais foram anestesiados com Xilasina (1ml/Kg) e Ketamina (0,6 ml/Kg). A administração de solução fisiológica 0,9% ou papaína foi realizada pela incisão cirúrgica na traquéia, com agulha 13x4,5 acoplada a seringa plástica esterilizada por óxido de etileno.

Os ratos foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais: Grupo enfisema (GE) – 9 animais submetidos à instilação intratraqueal de solução fisiológica contendo papaína; Grupo controle (GC) – 10 animais submetidos à instilação intratraqueal de solução fisiológica isotônica. Os animais foram submetidos a controle semanal de peso. A coleta de sangue e sacrifício foi realizada no 20º dia. Os animais experimentais e controles foram anestesiados utilizando-se éter etílico e sacrificados por decapitação, sendo retirado o lobo médio do pulmão direito para análise histológica e o músculo gastrocnêmio para análise histológica e pesagem.

A perda de massa corpórea (PMC) no 20º dia foi utilizada como parâmetro para a avaliação do desenvolvimento de caquexia e foi calculada através da seguinte equação:

$$PMC (\%) = \frac{100 \times [MC_i - MC_f + GMC]}{[MC_i + GMC]}$$

Onde:

GMC: média do ganho de massa do grupo controle no 20º dia após a indução do enfisema;

MC_f: massa corpórea final do grupo enfisema;

MC_i: massa corpórea inicial do grupo enfisema;

3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO ENFISEMA PULMONAR

Após a retirada dos pulmões e músculo estriado esquelético, o lobo médio do pulmão direito e o gastrocnêmio direito foram submetidos à fixação imediata em formol 10%, por 24 horas. Após esse período, foram deixados, por uma hora, em etanol a 70%, progressivamente em concentrações mais altas até etanol absoluto e, realizada diafanização. Em seguida, as peças foram incluídas em parafina, foram realizados cortes com espessura de 5µm e, posteriormente, feita a coloração com hematoxilina e eosina.

As fotomicrografias do parênquima pulmonar foram utilizadas para a análise qualitativa do enfisema pulmonar e do músculo gastrocnêmio.

O enfisema pulmonar foi determinado pelo número de vezes que estruturas do parênquima de troca gasosa interceptou um conjunto de retas coerentes. Assim, no enfisema pulmonar, a destruição alveolar é indicada pelo menor número de interceptos das estruturas alveolares com o sistema de retas.

Foram escolhidos aleatoriamente cinco campos microscópicos não coincidentes, com aumento de 100 vezes com o objetivo de analisar qualitativamente os aspectos histopatológicos do parênquima pulmonar submetido à ação da papaína ou solução fisiológica (FUSCO et al., 2002).

3.5 OBTENÇÃO E PREPARO DO SANGUE

A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca com seringa de plástico de 5ml e agulha de 25mm x 8mm com retirada de aproximadamente 3 ml de sangue. O sangue coletado foi colocado em tubo de ensaio de vidro heparinizado e centrifugado sobre refrigeração à 4°C e 1.500 rpm, durante 10min. Em seguida, foi retirado 500 µL do sobrenadante, plasma, e introduzido em tubo de ensaio do tipo *Eppendorf*, e armazenado a -86°C.

A lavagem das hemácias foi realizada acrescentando 1 ml de NaCl 0,9% para posterior centrifugação seguindo os mesmos parâmetros citados anteriormente, sendo este procedimento realizado três vezes.

3.6 AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO

A lesão lipoperoxidativa foi avaliada na papa de hemácias dos animais experimentais e controles através da reação de quimiluminescência (QL) iniciada pelo t-butil hidroperóxido em presença de hidroperóxidos lipídicos, conforme descrito por Gonzalez-Flecha e colaboradores (1991). O t-butil hidroperóxido provoca a iniciação da reação com peróxidos pré-existentes, os quais reagem em cadeia doando elétrons para outro radical peroxil, emitindo luz, lida por quimiluminescência.

A papa de hemácias (30 μ l) foi diluída em 3 ml de KH_2PO_4 e, 1 ml desta diluição, em 12,3 ml do mesmo tampão. Para o ensaio foi utilizado 1 ml desta amostra, a qual foi incubada a 37°C por 5 min e adicionado 10 μ l de t-butil hidroperóxido (*t*-BOOH) 6 mM para posterior análise.

O espectro de quimiluminescência foi monitorado durante 60 minutos pelo luminômetro modelo TD 20/20 (Turner Designs, EUA), com capacidade de detecção em comprimentos de onda de 300 a 650 nm e 68,5% de sensibilidade a 30°C. O luminômetro foi conectado a um microcomputador através do programa Spreadsheet Interface v1.0, dessa forma, foi realizado o registro da quimiluminescência emitida.

Na avaliação da lipoperoxidação, os resultados das amostras foram corrigidos por mg de proteína através da multiplicação dos valores da curva de emissão pelo seu respectivo fator e os valores foram expressos em URL/mg de proteína.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP) DO PLASMA

A técnica do TRAP (REPETTO et al., 1996), a qual mede os níveis de antioxidantes totais de um tecido, principalmente antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis de baixa massa molecular, foi utilizada para detectar a capacidade antioxidante do plasma. Neste método, o 2,2- azo-bis (2-amidinopropano diidroclorido-ABAP), um sistema gerador de radical alcooxil por decomposição térmica, produz fótons que são amplificados pelo luminol e aferidos por luminescência em luminômetro TD 20/20 em ambiente de baixa luminosidade. Para as análises, as amostras de plasma foram diluídas em tampão glicina a 37°C (1:3) e lidas por um tempo de 45 minutos.

A oxidação do ABAP gera uma curva de emissão que, com a adição do trolóx, um antioxidante análogo da vitamina E, na reação, inibe a oxidação do ABAP por um determinado tempo. O tempo em que o trolóx consegue reter a emissão causada pela oxidação do ABAP é denominado “tempo de indução do Trolox” (Ti_{Trolox}). Da mesma forma, a adição do plasma no meio de reação pode reter a oxidação do ABAP, proporcionalmente à quantidade de antioxidantes de cada amostra. O tempo em que a amostra consegue reter a emissão causada pela oxidação do ABAP é denominado “tempo de indução da amostra” ($Ti_{amostra}$). A comparação entre $Ti_{amostra}$ e Ti_{Trolox} após a adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma permite obter valores de TRAP em relação a concentração de μM de Trolox (Figura 6).

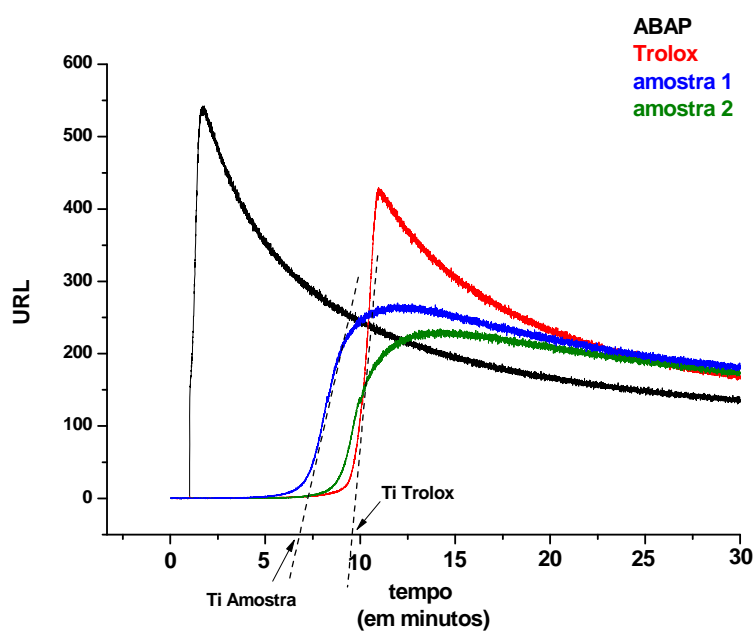


Figura 6 – Emissão de fótons na TRAP pelo tempo de reação em minutos.

Para obtenção do resultado foi usada a seguinte equação:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = Ti_{amostra} / Ti_{Trolox}$$

Onde: $Ti_{amostra}$: tempo de indução da amostra;

Ti_{Trolox} : tempo de indução provocado pela adição de μM de Trolox

3.8 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS CARBONILADAS

O ensaio carbonílico é utilizado para detectar o dano oxidativo das proteínas, pois os produtos contendo grupamentos carbonílicos são formados durante a oxidação de aminoácidos por espécies reativas e são identificados como derivados de hidrazonas a partir da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007). As lavagens consecutivas do plasma com ácido tricloroacético precipitam o conteúdo total de proteínas, e a incubação com 2,4-dinitrophenilhidrazina forma hidrazonas proporcionalmente ao conteúdo de proteínas carboniladas. A determinação da quantidade de proteínas carboniladas se dá pela leitura em espectrofotômetro, a 355-390nm, em comparação com a concentração total de proteínas (LEVINE et al., 1994).

3.9 QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A determinação da concentração de GSH nos eritrócitos foi realizada de acordo com o método proposto por Sedlak e Lindsay (1968). Este tripeptídeo existe sob duas formas, a reduzida e a oxidada, mas, *in vivo*, é mantida, predominantemente, na forma reduzida pela ação da enzima glutathione redutase (Figura 3). Como a maior parte da GSH compreende os grupos sulfidrila, não protéicos, a quantificação de tióis solúveis em ácido pode ser empregada na quantificação dos níveis de GSH.

As amostras de papa de hemácia foram diluídas em água destilada (1:10) e lidas em uma absorbância de 412 nm por espectrofotometria. Os resultados das amostras foram comparados com os valores de absorbância do padrão, expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A quantificação da interferência do estresse oxidativo, provocado pela presença do enfisema, na determinação da SOD intracelular foi determinada pela técnica de

Marklund e Marklund (1974). Esta enzima catalisa a dismutação de O_2^- em H_2O_2 na presença do próton hidrogênio (H). Nesta técnica, volumes crescentes da amostra inibem a auto-oxidação do pirogálool em solução aquosa. Os resultados foram obtidos através da relação entre os valores detectados na amostra, composta por papa de hemácia diluída em água destilada (1:20) e no controle do pirogálool. Foram utilizados volumes de 5, 10 e 20 μ l, lidos em 420 nm por espectrofotometria. A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogálool foi definida como uma unidade de atividade enzimática (U). O resultado final foi expresso por U SOD/mg de proteína.

3.11 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada conforme método descrito por Cohen e colaboradores (1970) e Aebi (1984). A CAT é uma enzima que faz a dismutação do H_2O_2 , formado ao final da cadeia de transporte de elétrons, em H_2O e O_2 . A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o H_2O_2 é reduzido pela ação da enzima, provocando diminuição no valor da absorbância em 240 nm. A diferença na leitura das absorbâncias a 240 nm, em determinado intervalo de tempo, permite estabelecer a velocidade de redução do H_2O_2 , que é proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT.

Foram utilizados volumes de 15 μ l, em triplicata, com a amostra de papa de hemácia diluída em água destilada (1:20). Os resultados foram expressos em abs/min/mg de proteína.

3.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantidade de proteínas totais foi determinada, utilizando soro albumina bovina como padrão, conforme descrito por Lowry e colaboradores (1951) e modificado por Miller (1959). Este método de dosagem de proteína consiste de um meio alcalino tratado com soluções diluídas de íons cúpricos antes da adição do reagente Folin. Os compostos formados são lidos em espectrofotômetro a uma absorbância de 660 nm.

Foram utilizadas amostras de papa de hemácia diluídas em água destilada (1:3500). Os resultados foram expressos em mg de proteína /ml.

3.13 QUANTIFICAÇÃO DA PO₂ E PCO₂

A quantificação da pressão parcial de oxigênio (PO₂) e de gás carbônico (PCO₂) foi realizada através da gasometria venosa. A gasometria consiste na leitura das pressões parciais de O₂ e CO₂ em uma amostra de sangue. A leitura é obtida pela comparação desses parâmetros na amostra com os padrões internos do gasômetro (MYERS, 2002).

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão, analisados com o programa Origin 8.0 e utilizando-se o teste para amostras não pareadas (teste *t* de Student) para a análise estatística da quantificação do enfisema pulmonar, relação da massa do gastrocnêmio com a massa total, lipoperoxidação de membranas, capacidade antioxidante total, proteína carbonílica, SOD, CAT, GSH, PO₂ e PCO₂. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE INTERCEPTOS CRUZADOS

A figura 7 representa o número de vezes que estruturas do parênquima de troca gasosa intercepta um conjunto de retas coerentes. No GE o número de interceptos das estruturas alveolares com o sistema de retas é significativamente menor que no GC, $48,37 \pm 2,7$ e $54,49 \pm 1,16$, respectivamente, indicando destruição alveolar.

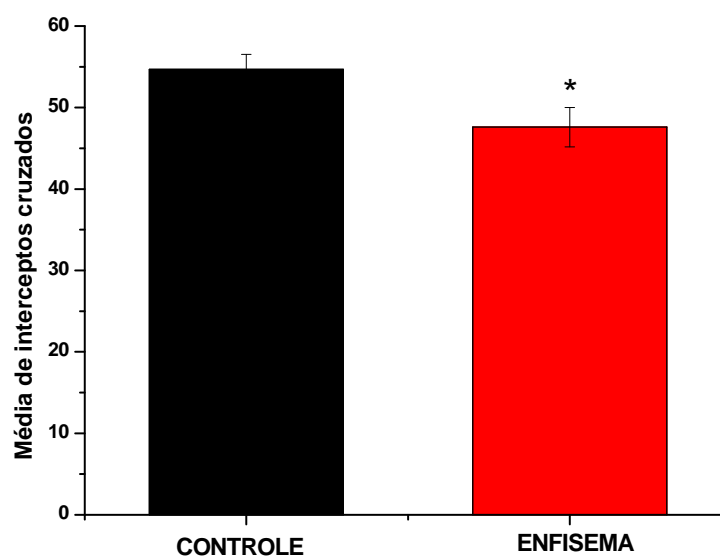


Figura 7 – Quantificação do número de interceptos cruzados.

O enfisema pulmonar foi quantificado pelo número de interceptos cruzados 20 dias após a instilação intratraqueal de salina (GC) e papaína (GE). Estes resultados representam média \pm erro padrão. Os valores de p foram determinados pelo teste *t* para amostras independentes. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO ENFISEMA PULMONAR

A figura 8 ilustra as alterações do parênquima pulmonar ocasionadas pela instilação intratraqueal de papaína quando comparada a instilação de solução fisiológica. Na

análise histológica dos animais do GC pôde-se observar preservação da estrutura de vasos, brônquios, bronquíolos e septos alveolares com manutenção do tamanho da luz e paredes alveolares. As análises dos animais do GE mostraram aumento dos espaços alveolares, com paredes alveolares delgadas e destruição de septos alveolares e capilares.

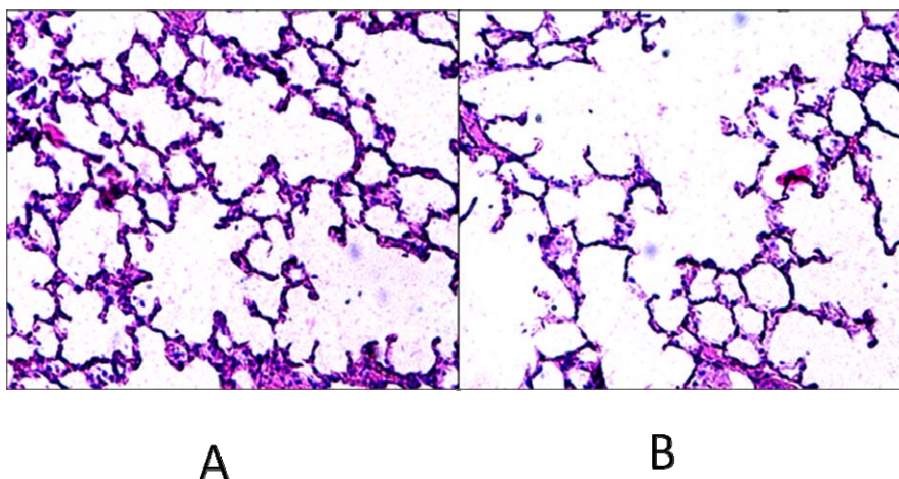


Figura 8 – Análise histológica do enfisema pulmonar

Fotomicrografia do parênquima pulmonar do grupo controle (A) e grupo enfisema (B) após 20 dias de instilação intratraqueal.

4.3 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA MUSCULAR

O valor da média de PMC do GE no 20º dia de indução em relação ao ganho de massa corporal do GC foi de $6,28 \pm 0,91$ %, correspondendo à caquexia.

4.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA DO GASTROCNÊMIO EM RELAÇÃO À MASSA CORPORAL TOTAL

A figura 9 representa as médias dos valores obtidos pela relação entre a massa do gastrocnêmio e a massa total do GC ou GE. Analisando o gráfico, observa-se que houve diminuição significativa entre os grupos na relação entre as massas avaliadas, sendo a média do GC $0,0038 \pm 0,0002$, e, $0,0030 \pm 0,0002$ do grupo GE.

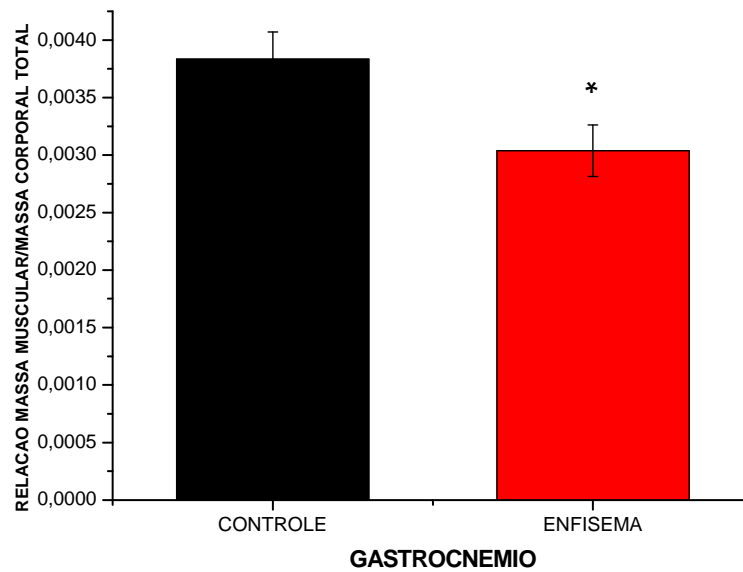


Figura 9 – Relação entre a massa muscular e a massa corpórea

A diferença da massa muscular do gastrocnêmio foi quantificada pela relação entre a massa muscular e a massa corpórea 20 dias após a instilação intratraqueal de salina (GC) e papaína (GE). Estes resultados representam média \pm erro padrão. Os valores de p foram determinados pelo test *t* para amostras independentes. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO GASTROCNÊMIO

A figura 10 ilustra as alterações no músculo gastrocnêmio ocasionadas pela instilação intratraqueal de papaína quando comparada a instilação de solução fisiológica. As análises microscópicas dos cortes histológicos do tecido muscular do GE mostraram discreta desorganização e diminuição do diâmetro das fibras quando comparadas ao GC.

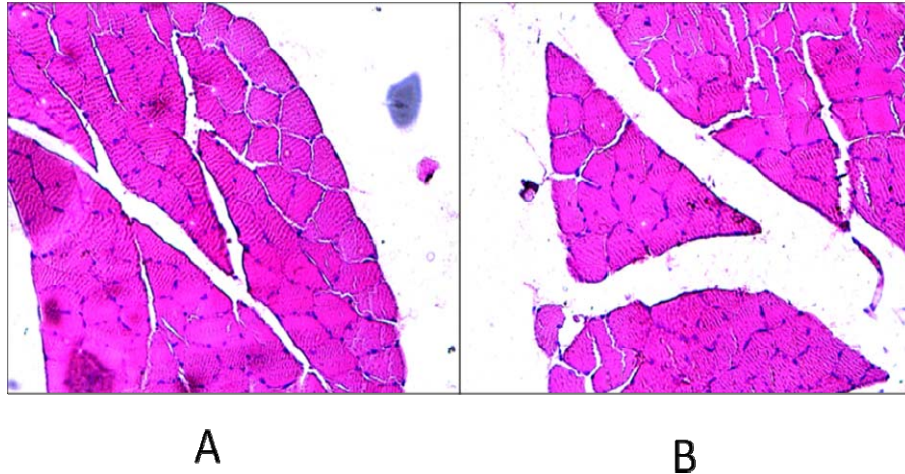


Figura 10 – Análise histológica do gastrocnêmio

Fotomicrografia do gastrocnêmio do grupo controle (A) e grupo enfisema (B) após 20 dias de instilação intratraqueal.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS DE HEMÁCIAS

As concentrações de lipoperóxidos das hemácias foram determinadas pelo método de QL induzida por tert-butil. A figura 11 ilustra a quimiluminescência emitida no 20º dia após a instilação intratraqueal de solução fisiológica ou papaína. A média dos valores obtidos pelo GC e GE no 20º dia foi de 6885 ± 1049 e 14466 ± 877 , respectivamente. Observa-se um aumento significativo da média da área do GE em relação ao GC, indicando aumento nos níveis de lipoperóxidos de membrana nos animais com enfisema pulmonar.

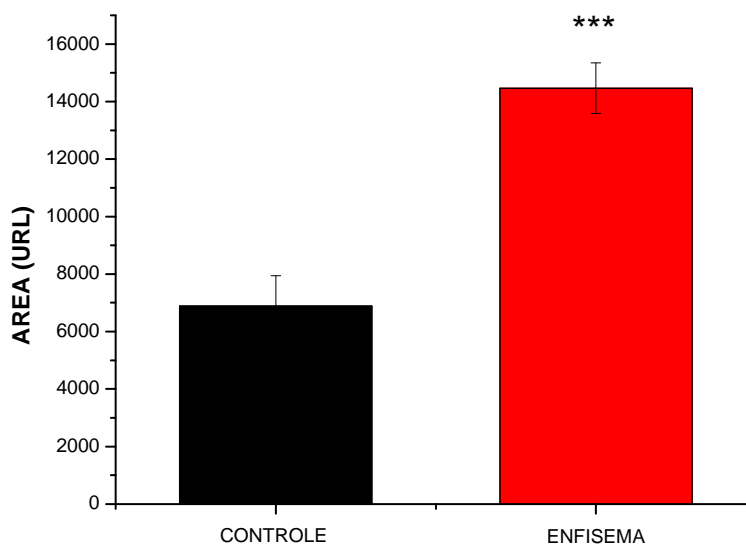


Figura 11 – QL de hemácias mostrando a média da área da concentração de lipoperóxidos.

Os níveis de lipoperóxidos foram determinados por QL induzida por tert-butil 20 dias após a instilação intratraqueal de salina (GC) ou papaína (GE). Estes resultados representam média \pm erro padrão. Os valores de p foram determinados pelo test *t* para amostras independentes. *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle.

4.7 CURVAS REPRESENTATIVAS DA QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR TERT-BUTIL

A figura 12 mostra as curvas de QL para determinação do estresse oxidativo de hemácias representadas por um animal com enfisema pulmonar e um com instilação intratraqueal de solução salina. O valor de V_0 representa a velocidade de subida da fase ascendente da reação obtida por regressão linear.

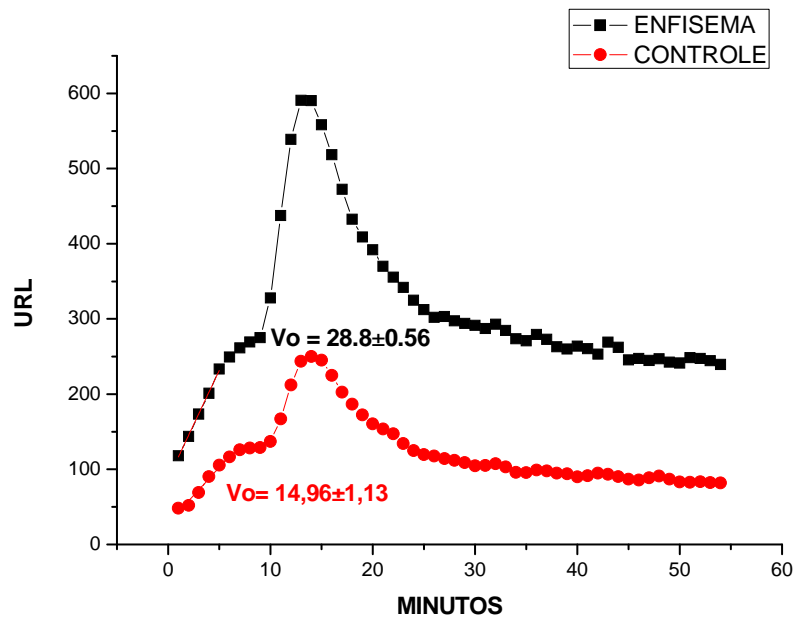


Figura 12 – Curvas representativas do estresse oxidativo nas hemácias.

Os níveis de lipoperóxidos foram determinados por QL induzida por tert-butil 20 dias após a instilação intratraqueal de salina (GC) ou papaína (GE). O valor de V_o representa a velocidade de subida da fase ascendente da reação obtida por regressão linear

4.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA

A capacidade antioxidante total do plasma (TRAP), representada pela presença de antioxidantes solúveis de baixo peso molecular 20 dias após a intilação intratraqueal de salina ou papaína está ilustrada na figura 13. A média dos valores obtidos no GC e GE foram $74 \pm 6,5$ e $65 \pm 6,4$, respectivamente. Não foram observadas diferenças significantes na capacidade antioxidante total do plasma do GE em relação ao GC.

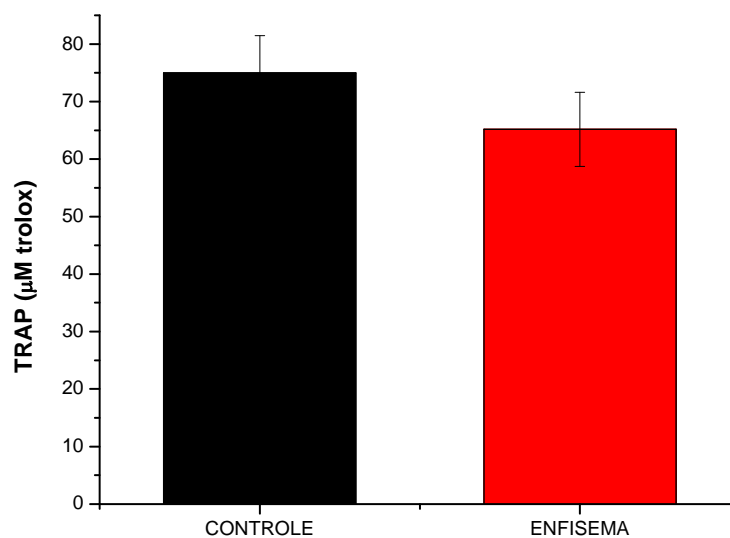


Figura 13 – Capacidade antioxidante total do plasma (TRAP)

A presença de antioxidantes solúveis de baixo peso molecular foi determinada pela capacidade antioxidante total (TRAP) 20 dias após a instilação intratraqueal de salina (GC) ou papaína (GE). Estes resultados representam média \pm erro padrão. Os valores de *p* foram determinados pelo teste *t* para amostras independentes. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

4.9 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS CARBONILADAS NO PLASMA

A figura 14 representa a concentração de proteínas carboniladas no plasma dos animais do GC e GE. A média dos valores obtidas no GC e GE no 20º dia foram $0,024 \pm 0,0001$ e $0,034 \pm 0,0002$. As concentrações de proteínas carboniladas apresentaram-se aumentadas significativamente no GE.

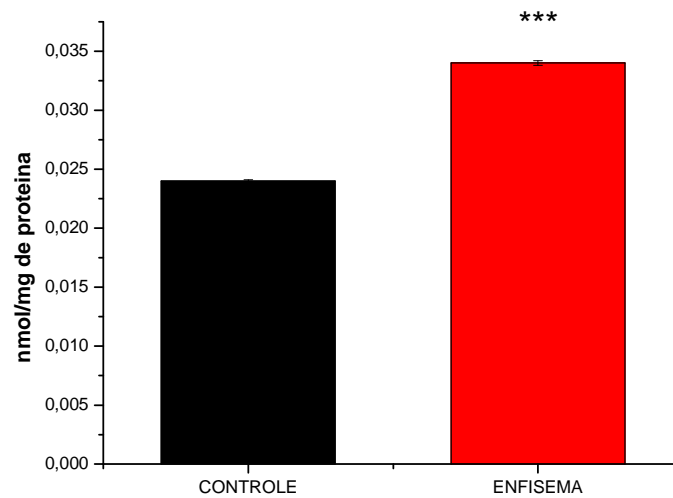


Figura 14 – Concentração de proteínas carboniladas no plasma

Concentração de proteínas carboniladas no plasma 20 dias após a instilação intratraqueal de salina (GC) ou papaína (GE). Estes resultados representam média \pm erro padrão. Os valores de *p* foram determinados pelo test *t* para amostras independentes. *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle.

4.10 DETERMINAÇÃO DA SOD, CAT, GSH

A figura 15 ilustra a quantificação da concentração de SOD e GSH e atividade da catalase do GC e GE no 20º dia após a indução dos grupos experimentais. As médias dos valores de SOD, GSH e catalase obtidos no grupo controle e enfisema, respectivamente, foram $4,72 \pm 0,68$ e $11,26 \pm 2,23$; $0,31 \pm 0,02$ e $0,28 \pm 0,05$; $0,45 \pm 0,02$ e $1,06 \pm 0,11$. Foi observado aumento significativo da concentração de SOD e atividade da catalase do grupo enfisema em relação ao controle, sem diferença significativa nos níveis de GSH.

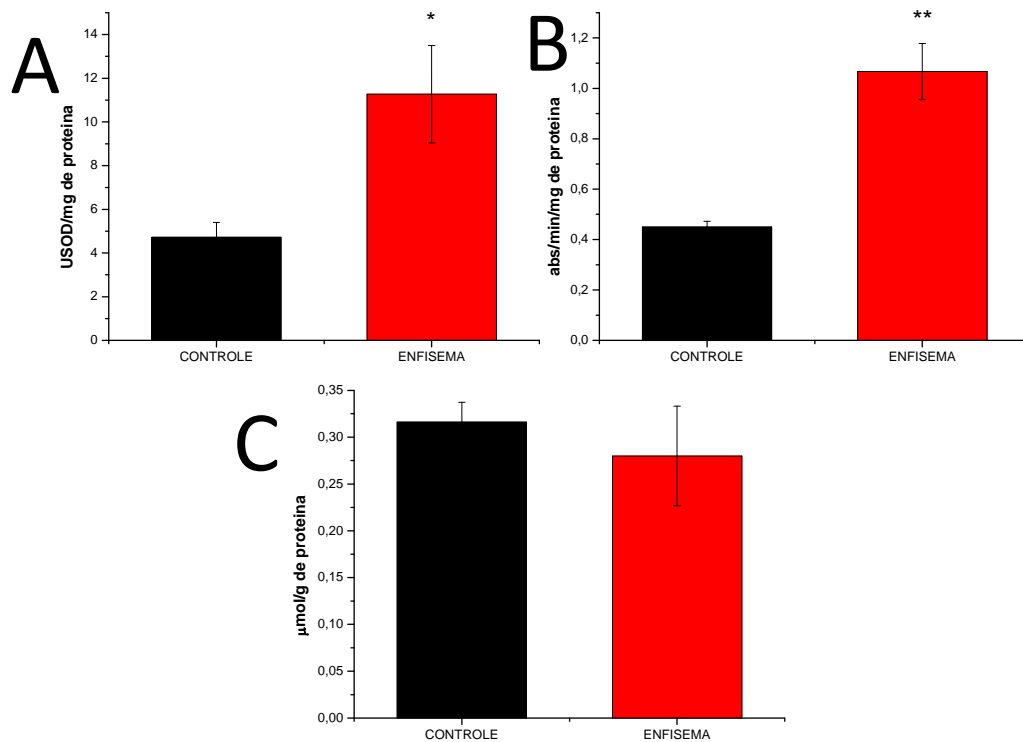


Figura 15 – Concentração de SOD e GSH e atividade da catalase no hemolisado de hemácias.

Determinação da concentração de SOD e GSH e atividade da CAT 20 dias após a instilação intratraqueal de salina ou papaína. (A) Quantificação da SOD. (B) Atividade da catalase. (C) Concentração de GSH. Estes resultados representam média \pm erro padrão. Os valores de p foram determinados pelo test *t* para amostras independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DA PO_2 E PCO_2

A figura 16 representa os valores de PO_2 e PCO_2 no GC e GE após 20 dias da instilação de salina ou papaína. A média da PO_2 do GC e GE foram $40,26 \pm 5,83$ e $34,36 \pm 7,82$, respectivamente e, da PCO_2 , $57,26 \pm 3,03$ e $57,08 \pm 3,90$, respectivamente. Podemos observar que não houve diferença significativa entre as médias do GC e GE.

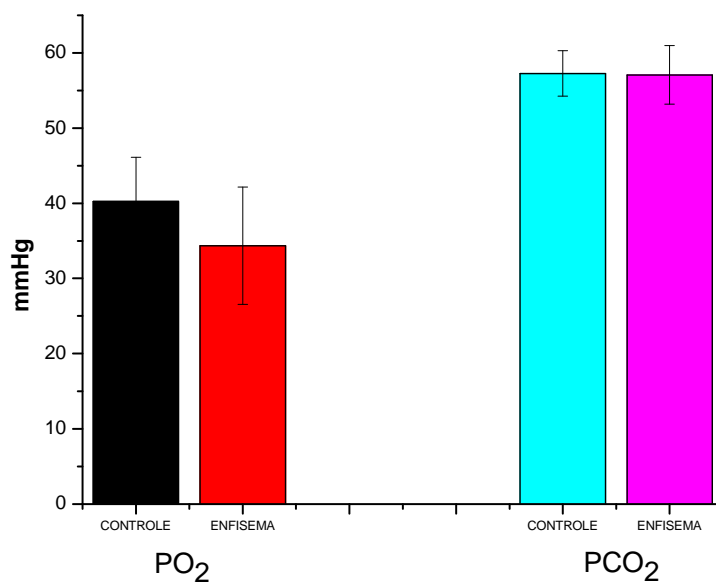


Figura 16 – Pressões de O₂ e CO₂ no sangue venoso.

Determinação das pressões parciais de O₂ e CO₂ 20 dias após a instilação intratraqueal de salina (GC) ou papaína (GE). (PO₂) Colunas referentes a PO₂ do GC e GE. (PCO₂) Colunas referentes a PCO₂ do GC e GE.. Estes resultados representam média ± erro padrão. Os valores de p foram determinados pelo test *t* para amostras independentes. **p* < 0,05 em relação ao respectivo controle.

5 DISCUSSÃO

O enfisema pulmonar é uma doença caracterizada por alterações pulmonares (AGUSTI *et al.*, 2003), incluindo estresse oxidativo (WHITE *et al.*, 1985; HEFFNER *et al.*, 1989) e efeitos sistêmicos com perda de peso, anormalidades nutricionais e disfunção músculo-esquelética (SCHOLS *et al.*, 1998).

O enfisema experimental em ratos, com instilação intratraqueal de papaína, resulta em alterações morfo-histológicas e fisiológicas dos pulmões equivalentes às alterações encontradas no enfisema em seres humanos (GROSS *et al.*, 1964; HAYES *et al.*, 1975). Estudos realizados em cães, com instilação ou nebulização de solução de papaína, reproduziram o enfisema pulmonar, com alterações da mecânica ventilatória, também semelhantes às alterações funcionais em humanos (TAKARO; WHITE, 1972; HADDAD *et al.*, 1979)

Tepper e colaboradores (2000) utilizaram instilação intratraqueal de elastase que causou lesão enfisematosa progressiva em ratos, estabilizada em nove semanas. Van de Lest e colaboradores. (1985) mostraram que a indução do enfisema por elastase levou a digestão de proteoglicanos do tecido pulmonar poucas horas depois da administração, continuando por 40 dias e se correlacionando com a gravidade do enfisema. Já Jansson e colaboradores (2006) mostraram um desenvolvimento progressivo do enfisema induzido por elastase por até quatro semanas. Mattson e colaboradores (2002) reproduziram o enfisema pan-acinar em hamsters com a instilação intratraqueal de elastase e observaram aumento da complacência estática pulmonar, elevação do volume pulmonar e redução da superfície de troca.

Entretanto Snider (1992) e Snider e colaboradores. (1986) relatam que a papaína produz uma indução eficiente do enfisema pulmonar pan-acinar após simples instilação assim como outras proteinases como a elastase neutrofílica humana e a elastase pancreática suína. Este efeito está relacionado à atividade elastolítica da papaína que leva a um quadro grave de enfisema pulmonar (GRONEBERG; CHUNG, 1994).

No modelo de instilação intratraqueal de papaína, proposto neste estudo, observamos a instalação do enfisema pulmonar pan-acinar com uma única provocação de papaína, num período de 20 dias.

Dentre os mecanismos pulmonares responsáveis pela DPOC está o desequilíbrio entre as concentrações de oxidantes e antioxidantes que desempenham um papel

importante na patogênese da doença, sendo que ocorre um aumento da carga oxidativa nos pulmões, relacionada diretamente com a lesão das células pulmonares (MACNEE, 2005).

O aumento do H_2O_2 no ar exalado por indivíduos fumantes, originado pela produção aumentada de O_2^- pelos macrófagos alveolares (NOWAK et al., 1999; MACNEE et al., 1999) e o aumento da exalação de NO, o qual pode ser considerado um marcador de inflamação pulmonar e, indiretamente, de estresse oxidativo (ALVING et al., 1993; CORRADI et al., 2001;) tem sido relatados.

Além do estresse oxidativo pulmonar, existem evidências da presença de radicais livres na circulação (RAHMAN et al., 1997), contribuindo para o desenvolvimento e progressão da DPOC e suas manifestações sistêmicas (BOOTS et al., 2003).

Segundo Boveris et al. (1983), a quimiluminescência por *t*-BOOH é uma técnica sensível que pode ser aplicada para determinar a existência de estresse oxidativo associado a situações patológicas experimentais. Neste estudo, a lipoperoxidação de hemácias e a carbonilação protéica apresentaram-se aumentadas no 20º dia do enfisema pulmonar, visto que a reatividade das EROs pode causar reações de oxidação que podem levar a lesões irreversíveis aos constituintes celulares. Se estas lesões não forem reparadas poderão alterar a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (PEREIRA, 2003).

As células controlam ativamente a composição de seus ambientes, externo e interno, garantindo a homeostase. Sob estresse fisiológico ou estímulos patológicos, as células passam por adaptação visando manter sua viabilidade no novo ambiente (KUMMAR et al., 2005).

A ocorrência de estresse oxidativo moderado é, freqüentemente, acompanhado do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996).

Devido a produção das EROs, as células podem desenvolver um mecanismo de defesa celular denominado sistema de defesa antioxidante. O termo antioxidante é utilizado para definir o conjunto enzimático ou não de sistemas que protegem as macromoléculas ou estruturas celulares contra os efeitos potencialmente danosos de reações que promovem a oxidação. Quando o balanço oxidativo celular é alterado há uma resposta inicial e rápida, resultante da ativação de um sistema de proteção pré-existente, bem como a ativação de um mecanismo de transdução de sinais que levará a ativação da resposta secundária caracterizada pela síntese de proteínas e moléculas de proteção celular (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

Os resultados observados neste estudo revelam, no 20º dia, aumento da concentração de SOD e da atividade da catalase, sem alterações na GSH e capacidade antioxidante total. Isto indica a participação do mecanismo protetor à lipoperoxidação das hemácias com produção das enzimas SOD e ativação da CAT, pois o O_2^- é o primeiro radical a se formar durante a ativação da NADPH oxidase, sendo necessária a mobilização de SOD para catalisar a dismutação do respectivo ânion em H_2O_2 . A enzima CAT é considerada o principal componente da defesa antioxidante primária, atuando na catálise da decomposição de H_2O_2 em água e dividindo esta função com a GPx. Na presença de baixos níveis de H_2O_2 , os peróxidos orgânicos são eliminados preferencialmente pela glutathione peroxidase, oxidando GSH, enquanto que, em altas concentrações, predomina a ação da catalase (CHUNG-MAN et al., 2001), como observado no 20º dia. Entretanto, estas enzimas não foram suficientes para evitar a lipoperoxidação.

Gan e colaboradores (2004) relatam que os leucócitos e as concentrações de TNF- α e IL-6 encontram-se elevados no sangue na DPOC. Isto também explicaria os níveis aumentados de SOD aos 20 dias, pois os leucócitos aumentam a oferta de O_2^- , e, conseqüentemente, H_2O_2 (NADEEM et al. 2005). Joppa e colaboradores (2007) não encontraram diferença significativa na SOD e CAT, mas diminuição da glutathione peroxidase entre indivíduos DPOC em estágio mais avançado da doença.

Segundo Silva (2009), o sistema antioxidante enzimático eritrocitário tem papel importante na manutenção do equilíbrio oxidativo celular. De maneira geral, em resposta à constante exposição ao estresse oxidativo, o sistema antioxidante reage inicialmente com um decréscimo das enzimas antioxidantes, seguido por elevação das mesmas devido à mobilização dos estoques em outros órgãos e aumento na produção observado no 20º dia.

As agressões geram sinais que induzem a respostas teciduais adaptativas para tornar os tecidos mais resistentes às lesões posteriores. Estes sinais não são bem estabelecidos, mas incluem a expressão de proteínas de choque térmico (HSP) que aumentam a resistência à desnaturação de proteínas e estabilidade de membranas (FAUSTO et al., 2005; FILHO, 2006).

Entretanto, ao analisarmos a relação da massa do gastrocnêmio com a massa corporal total e a perda de massa corporal dos animais do GE em relação ao GC observamos que, no modelo proposto, o estresse oxidativo sistêmico pode estar relacionado com a agressão ao tecido muscular.

Karadag e colaboradores (2004) avaliaram os níveis TNF- α e MDA no soro e hipoxemia de pacientes com DPOC fumantes e ex-fumantes, relacionados ao índice de massa corpórea e função pulmonar, e não observaram diferenças significativas entre os grupos. Já Van Helvoort e colaboradores (2007) correlacionaram a perda de massa muscular, avaliada pelo índice de massa magra, ao aumento de IL-6 e MDA no soro de pacientes com DPOC, ex-fumantes, imediatamente após o exercício. Estes mesmos autores em 2006 relacionaram a diminuição de força muscular a oxidação de proteínas, diminuição da relação GSSG/GSH e aumento de IL-6.

As hemácias são reservatórios de muitos antioxidantes scavengers de EROs (VAN ASBECH et al., 1985; AGAR et al., 1986; TOTH et al., 2004). Concentrações aumentadas de GSH e SOD nas hemácias foram encontradas na DPOC como resposta ao estresse oxidativo. O O₂⁻ pode atravessar facilmente a membrana das hemácias e a SOD age como scavenger (LYNCH et al., 1978). O peróxido de hidrogênio produzido deve ser decomposto por níveis normais de CAT e aumento de GSH (VAN ASBECH et al., 1985).

Richard e colaboradores (1989) mostraram aumento da geração de oxidantes por leucócitos do sangue periférico de indivíduos com DPOC, detectado por quimiluminescência, sugerindo que as EROs participam das anormalidades da DPOC.

Os antioxidantes, que funcionam como scavengers de EROs presentes na circulação ou seqüestradas dos vasos pulmonares, indicam a habilidade individual de prevenir as lesões do estresse oxidativo (SCHOLS et al., 1996; TAKABATAKE et al., 1999). Rahman e colaboradores (1996) observaram aumento da capacidade antioxidante total do plasma na DPOC durante períodos de exacerbação e estabilidade da doença, sendo maior nos episódios de exacerbação. Entretanto, neste modelo, o aumento das enzimas SOD e CAT não foi suficiente para evitar a lipoperoxidação e a carbonilação protéica, com conseqüente lesão a estrutura muscular.

O estresse oxidativo contribui para o processo normal do envelhecimento, caracterizado por perda de massa muscular. Este mesmo mecanismo pode ser sugerido na DPOC (BROSS et al., 1999; WOODS et al., 2000). Mattson e colaboradores (2002), ao analisarem o estresse oxidativo dos músculos gastrocnêmio e vasto lateral de hamsters, associaram a lipoperoxidação à diminuição da capacidade de exercício e perda de massa muscular.

Andrade e colaboradores (1998), Supinski e colaboradores (1999) e Heunks e colaboradores (2000) sugeriram disfunção na contratilidade do músculo esquelético, associado ao estresse oxidativo muscular, demonstrando que a exposição crônica das fibras ao

H₂O₂ reduz a geração de força máxima e submáxima. A possível explicação para este mecanismo pode ser a diminuição da liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático ou redução da sensibilidade do músculo esquelético pela exposição ao H₂O₂ (BROTTO et al., 1996).

As espécies reativas de oxigênio também têm sido implicadas na disfunção enzimática na via glicolítica, ciclo do ácido cítrico e sistema de transporte de elétrons, prejudicando a energética celular (ANDERSSON et al., 1998; CORRETI et al., 2001).

Além da participação das citocinas pulmonares, liberadas na circulação, e do estresse oxidativo sistêmico, na perda de massa muscular, a redução da PO₂ no sangue arterial pode levar a hipóxia tecidual e, conseqüentemente, ao descondicionamento (DOURADO et al., 2006). A PO₂ e PCO₂ no sangue venoso indicam a adequácia do fluxo sanguíneo e estado do consumo de oxigênio (MYERS, 2002). Como no modelo estudado não foi observada diferença significativa entre estes valores, podemos sugerir que o mecanismo responsável pela perda de massa corporal é o estresse oxidativo.

Gomes-Marcondes e Tisdale (2002) e Mastrocolla e colaboradores (2008) demonstraram interação entre estresse oxidativo moderado e proteólise em outros modelos de perda de massa muscular, como inatividade, diabetes e câncer experimentais, com o envolvimento das três principais vias degradadoras de proteína: o sistema lisossomal, o sistema calpaína/caspase dependente de cálcio, e o sistema ATP-ubiquitina-proteasoma independente de cálcio e sem limite de saturação de substrato, ou seja, proteínas que por serem submetidas a algum tipo de lesão, tem sua estrutura modificada e se tornam sem função. Portanto, o estresse oxidativo pode estar envolvido na ativação das vias proteolíticas na DPOC.

Estudos prévios em nosso laboratório, utilizando como modelo experimental hamsters Sírio (dados não publicados) indicam que a utilização de vitamina E, intraperitonealmente, pode reverter a perda de massa corpórea e muscular dos animais com enfisema pulmonar. Assim, sugere-se a participação do estresse oxidativo sistêmico na perda de massa muscular na DPOC experimental.

6 CONCLUSÃO

No modelo experimental de DPOC induzida por instilação intratraqueal de papaína, houve aumento da lipoperoxidação das hemácias, evidenciado pela quimiluminescência, sendo acompanhado por aumento dos níveis de SOD e CAT aos 20 dias.

O aumento destas enzimas antioxidantes, não foi capaz de proteger as hemácias de lesão e do estresse oxidativo sistêmico, levando a perda de massa muscular, em ratos Wistar, que é um dos efeitos sistêmicos da DPOC na progressão da doença.

Esses resultados apresentam evidências experimentais de estresse oxidativo sistêmico na evolução da DPOC e sugere sua participação na perda de massa corporal e muscular.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. 1984. v.105, p.121-126.
- AGAR, N. S.; SADRADEH, S. N. H.; HALLAWAY, P. E.; EATON, J. W. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense. **J. Clin. Invest.** 1986. 77:319–321.
- AGUSTÍ, A. G. N. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. In: Chadwick, D.; Goode, J. A. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Pathogenesis to Treatment*. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd. 2001. p. 242–254.
- AGUSTÍ, A. G. N.; NOGUERA, A.; SAULEDA, J.; SALA, E.; PONS, J.; BUSQUETS, X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**. 2003. 21: 347–360.
- AGUSTÍ, A. G. N. COPD, a multicomponent disease: implications for management. **Respiratory Medicine**. 2005. 99: 670–682.
- AGUSTÍ, A. G. N.; NOGUERA, A.; SAULEDA, J.; SALA, E.; PONS, J.; BUSQUETS, X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. **Proc Am Thorac Soc**. 2005. v. 2. p. 367–370.
- ALLAIRE, J.; MALTAIS, F.; DOYON, J. F.; NOEL, M.; LEBLANC, P.; CARRIER, G. Peripheral muscle endurance and the oxidative profile of the quadriceps in patients with COPD. **Thorax**. 2004;59(8):673-8.
- ALMEIDA, A. P. B. Inflammation and chronic obstructive pulmonary disease. **Rev Port Pneumol VII**. 2001. (1):57.
- ALVING, K.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. M. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. **Eur Respir J**. 1993; 6: 1368–1370.
- ANDERSON, M. E.; MEISTER, A. Transport and direct utilization of gammaglutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1983.80(3):707-11.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**. 1996. v.350, n.1, p.103-108, 1996.

ANDERSSON, U.; Leighton, B.; Young, M. E.; Blomstrand, E.; Newsholme, E. A. Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vivo by superoxide anions and/or nitric oxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. 512- 516.

ANDRADE, F. H.; REID, M. B.; ALIEN, D. G.; Westerblad, H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse, *J. Physiol.* 1998. 565-575.

ARGILÉS, J. M. Cancer associated malnutrition. *European Journal of Oncology Nursing.* 2005. 9: 39-50.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. *Rev. Nutr., Campinas.* 1999. 12(2): 123-130.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003; 22: 46, 14-27.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.; VARSAVSKY, A.; KOCH, O. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys.* 1983. v. 227, 534-541.

BROSS, R.; JAVANBAKHT, M.; BHASIN, S. Anabolic interventions for aging-associated sarcopenia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999. 84: 3420-3430.

BROTTO, M. A. P.; NOSEK, T. M. Hydrogen peroxide disrupts Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 1996. 731-737.

ÇALIKOĞLU, M.; ÜNLÜ, A.; TAMER, L.; ERCAN, B.; BUĞDAYCI, R.; ATIK, U. The Levels of Serum Vitamin C, Malonyldialdehyde and Erythrocyte Reduced Glutathione in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and in Healthy Smokers. *Clin Chem Lab Med.* 2002. 40(10):1028-31.

CANTOR, J. O.; SHTEYNGART, B.; CERRETA, J. M.; LIU, M.; ARMAND, G.; TURINO, G. M; The effect of hyaluronan on elastic fiber injury in vitro and elastase-induced airspace enlargement in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000. 225(1): 65-71.

CHENG, S. L.; YU, C. J.; CHEN, C. J.; YANG, P. C. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J.* 2004 23: 818-824.

CHUNG-MAN, H. J.; ZHENG, S.; COMHAIR, S. A.; FARVER, C.; ERZURUM, S. C. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. **Cancer Res.** 2001.61:8578-85.

COHEN, G.; DEMBIEC, D.; MARCUS, J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. **Anal Biochemistry.** 1970. v.34, p.30-8.

CORRADI, M.; MONTUSCHI, P.; DONNELLY, L. E.; PESCI, A.; KHARITONOV, S. A.; BARNES, P. J. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. **Am J Respir Crit Care Med.** 2001; 163: 854–858.

CORRETTI, M. C.; KORETSUNE, Y.; KUSUOKA, H.; CHACKO, V. P.; ZWEIER, J. L.; MARBAN, E. Glycolytic inhibition and calcium overload as consequences of exogenously generated free radicals in rabbit hearts. **J. Biol. Chem.** 1991. 12086-12091.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Mol. Asp. Med.** 2001. 22:217-246.

DELANO, M.J.; MOLDAWER, L.L. The Origins of Cachexia in Acute and Chronic Inflammatory Diseases. **Nutrition in Clinical Practice.** 2006. v.21, p.68-81.

DOUGLAS, K. T. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.** 1987. 59:103-67.

DOURADO, V. Z.; TANNI, S. E.; VALE, S. A.; FAGANELLO, M. M.; SANCHEZ, F. F.; GODOY, I. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. **J. bras. pneumol.** 2006. v.32, p. 161-171.

ENGELLEN, M. P.; SCHOLS, A. M.; DOES, J. D.; WOUTERS, E. F. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Clin Nutr.** 2000. 71(3):733-8.

FAUSTO, N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K. **Robbins & Cotran, Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 7. ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia.** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Curr Opin cell biol.** 2003. 15:247-254.
FLETCHER, C.; PETO, R. The natural history of chronic airflow obstruction. **BMJ.** 1977.I:1645-1658.

FUSCO, L. B.; PEGO-FERNANDES, P. M.; XAVIER, A. M.; PAZETTI, R.; RIVERO, D. H. R. F.; CAPELOZZI, V. L.; JATENE, F. B. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzidos por papaína. **J Pneumol.** 2002; 28:1-7.

GAN, W. Q.; MAN, S. F.; SENTHILSEVAN, A.; SIN, D. D. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. **Thorax.** 2004. 59:574-580.

GOLD, D. R.; WANG, X.; WIPYI, D.; SPEIZER, F. E.; WARE, J. H.; DOCKERY, D. W. Effects of cigarette smoking on lung function in adolescent boys and girls. **N Engl J Med.** 1996. 335: 931-7.

GOMES-MARCONDES, M. C.; TISDALE, M. J. Induction of protein catabolism and the ubiquitina proteasome pathway by mild oxidative stress. **Cancer Lett.** 2002. 180: 69-74.

GONZALEZ-FLECHA, B. LLESUY, B.; BOVERIS, A.; Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsias of hesrt, liver and muscle. **Free Radic Biol Med.** 1991. 10:93-100.

GRONEBERG, D. A.; CHUNG, K. F. Models of chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Research.** 2004. 5:1-16.

GROSS, P.; BAJAK, M. A.; TOLKER, E.; KASCHAK, M. Enzymatically produced pulmonary emphysema: a preliminary report. **J Occup Med.** 1964.6: 481-3.

GROSS, P.; PFITZER, E. A.; TOLKER, E.; BABYAK, M. A.; KASCHAK, M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. **Arch Environ Health.** 1965.11:50-8.

HADDAD, A. G.; PIMMEL, R. L.; SCAPEROTH, D. D.; BROMBERG, P. A. Forced oscillatory respiratory parameters following papain exposure in dogs. **J Appl Physiol.** 1979.46:61-6.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals Biology and chemistry. **Oxford University Press.** New York, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. ed.4, 2007.

HANSEN, M. J.; GUALANO, R. C.; BOZINOVSKI, S.; VLAHOS, R.; ANDERSON, G. P. Therapeutic prospects to treat skeletal muscle wasting in COPD (chronic obstructive lung disease). **Pharmacology & Therapeutics**. 2006. 109: 162 – 172.

HAYES, J. A.; KORTHY, A.; SNIDER, G. L. The pathology of elastase-induced panacinar emphysema in hamsters. **J Pathol**. 1975;117:1-14.

HEFFNER, J. E.; REPINE, J. E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. **Am Rev Respir Dis** 1989. 140: 531–554.

HEUNKS, L. M. A.; BAST, A.; VAN HERWAARDEN, C. L. A.; HAENEN, G. R. M. M.; RICHARD DEKHUIJZEN, P. N. Effects of emphysema and training on glutathione oxidation in the hamster diaphragm. **J. Appl. Physiol**. 2000. 2054-2061.

JAGOE, R. T.; ENGELEN, M. P. K. J. Muscle wasting and changes in muscle protein metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J Suppl**. 2003. 46: 52-63.

JANSSON, A. H.; SMAILAGIC, A.; ANDERSSON, A. M. D.; ZACKRISSON, C. FEHNIGER, T. E.; STEVENS, T. R.; WANG, X. Evaluation of excised lung gas volume measurements in animals with genetic or induced emphysema. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. 2006. 150: 240–250.

JOPPA, P.; PETRAŠOVA, D.; STANCAK, B.; DORKOVA, Z.; TKACĀOVA, R. Oxidative stress in patients with COPD and pulmonary hypertension. **Wien Klin Wochenschr**. 2007. 119/13–14: 428–4.

KARADAG, F.; KARUL, A. B.; CILDAG, O.; ALTUN, C.; GURGEY, O. Determinants of BMI in patients with COPD. **Respirology**. 2004. 9: 70–75.

KUMMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Fundamentos de Robbins & Cotran Patologia**. 7 ed. Elsevier, 2005.

LANGSTEIN, H. N.; NORTON, J. A. Mechanisms of cancer cachexia. **Hematology/Oncology Clinics North America**. 1991. v. 5, p.103-123.

LARSSON, K. Aspects on pathophysiological mechanisms in COPD. **Blackwell Publishing Ltd Journal of Internal Medicine**. 2007. 262: 311–340.

LAURELL, C. B.; ERIKSSON, S. The electrophoretic alpha-1 globulin pattern of serum in alpha-1 antitrypsin deficiency. **Scan J Clin Lab Invest**. 1963. 15(2):132-140.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 1995.

LEVINE, R. L., WILLIAMS, J. A., STADTMAN, E. R., SHACTER, E. “Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins”, **Methods of Enzimology**. London: Lester Packer, 1994, 346-365.

LIU, C. S.; TSAI, C. S.; KUO, C. L.; CHEN, H. W.; LII, C. K.; MA, Y. S.; WEI, Y. H. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. **Free Radic Res**. 2003. 37(12):1307-17.

LYNCH, R. E.; FRIDOVICH, I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. **J. Biol .Chem**. 1978. 4697–4699.

LOWRY, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randal, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 1951. 193:265-75.

MACNEE, W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Proc Am Thorac Soc**. 2005. v. 2., 258–266.

MACNEE, W.; RAHMAN, I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**. 1999; 160: 58–65.

MAK, J. C. W. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. **Int J Tuberc Lung Dis**. 2008. 12(4):368–374.

MALTAIS, F.; SIMARD, A. A.; SIMARD, C.; JOBIN, J.; DESGAGNES, P.; LEBLANC, P. Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. **Am J Respir Crit Care Med**. 1996.153(1):288-93.

MALTAIS, F.; LEBLANC, P.; WHITTOM, F.; SIMARD, C.; MARQUIS, K.; BÉLANGER, M. Oxidative enzyme activities of the vastus lateralis muscle and the functional status in patients with COPD. **Thorax**. 2000;55(10):848-53.

MARKLUND, S. A.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pirogallol and convenient assay for superoxidase dismutase. **Eur J Biochem.** 1974. 47:469-74.

MARTORANA, P. A.; WUSTEN, B.; VAN EVEN, P.; GOBEL, H.; SCHAPER, J. A six-month study of the evolution of papain-induced emphysema in the dog. **Am Rev Respir Dis.** 1982. 126:898-903.

MASTROCOLLA, R.; REFFO, P.; PENNA, F.; TOMASINELLI, C. E.; BOCCUZZI, G.; BACCINO, F. M.; ARAGNO, M.; COSTELLI, P. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 44, 584-93, 2008.

MATTSON, J. P.; SUN, J.; MURRAY, D. M.; POOLE, D. C. Lipid peroxidation in the skeletal muscle of hamsters with emphysema. **Pathophysiology.** 2002. 215-221.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **J Biol Chem.** 1988. 263(33):17205-8.

MILLER, G. L. Protein determination for larger numbers of samples. **Analytical Chemistry.** 1959. 31:964.

MONTEIRO, R.; JATENE, F. B.; PAZETTI, R.; CORREIA, A. T.; MANOEL, L. A.; BERNARDO, W. M.; RIVERO, D. H. R. F.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação das alterações morfológicas cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar: estudo experimental em ratos. **Ver. Bras Cir Cardiovasc.** 2004. 19(4):341-347.

MONTUSCHI, P.; COLLINS, J. V.; CIABATTONI, G.; LAZZERI, N.; CORRADI, M.; KHARI, S. A.; BARNES, P. J. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. **Am J Respir Crit Care Med.** 2000. 162: 1175-1177.

MURRAY, R. K. **Harper: Bioquímica.** 7ed. São Paulo: Atheneu, 1994.

MYERS, G. J. Do you think Perfusionists should be recording the venous pH, PCO₂, SB and BE on their pump sheets ? **Perflist.** August, 2002.

NADEEM, A.; RAJ, H. G.; CHHABRA, S. K. Increased Oxidative Stress and Altered Levels of Antioxidants in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Inflammation.** 2005. v. 29, n. 1. 2005. p. 23-32.

NIU, R.; LIU, H.; F, J. Effects of shenmai and aminophylline on apoptosis of small airway smooth muscle cells and the expression of relevant genes in rats with emphysema. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**. 2002. 22(4):310-2.

NOWAK, D.; ANTCZAK, A; KROL, M. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. **Eur Respir J**. 1996; 9: 652–657.

PALOMBINI, B. C.; PORTO, N. S.; ARAÚJO, E.; GODOY, D. V. **Doenças da Vias Aéreas: Uma Visão Clínica Integradora**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

PAUWELS, R, A.; BUIST, A. S.; CALVERLEY, P. M. A. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global initiative for chronic obstructive lung disease. (GOLD) workshop summary. **Am J Respir Crit Care Med**. 2001. 163: 1256-1276.

PEREIRA, M.D. **Possíveis sensores envolvidos na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2003.

PINHO, R. A.; CHIESAB, D.; MEZZOMOB, K. M. ANDRADESA, M. E.; BONATTOA, F.; GELAINA, D.; DAL, F.; PIZZOLA,C.; KNORSTB, M. M.; MOREIRAA, J. C. F. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients submitted to a rehabilitation program. **Respiratory Medicine**. 2007. 101, 1830–1835.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. Bioenergética. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3 ed. São Paulo: Manole; 2000. p.21-44.

PRIOR,R. L. ; CAO,G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**. 1999. v.27, n.11/12, p.1173-1181.

RABE, K.; HURD, S.; ANZUETO, A.; BARNES, P. J.; BUIST, S. A.; CALVERLEY, P.; FUKUCHI, Y.; JENKINS, C.; RODRIGUEZ-ROISIN, R.; VAN WEEL, C.; ZIELINSKI, J. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease GOLD Executive Summary. **Am J Respir Crit Care Med**. 2007. v. 176, 532–555.

RABINOVICH, R. A.; ARDITE, E.; TROOSTERS, T.; CARBO, N.; ALONSO, J.; GONZALEZ DE SUSO, J. M.; VILARO, J.; BARBERA, J.A.; POLO, M. F.; ARGILES, J. M.; FERNANDEZ CHECA, J. C.; ROCA, J. Reduced muscle redox capacity after endurance training in COPD patients. **Am J Respir Crit Care Med**. 2001;164:1114–1118.

RAHMAN, I.; MORRISON, D.; DONALDSON, K.; MACNEE, W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. **Am J Respir Crit Care Med.** 1996. 154: 1055–1060.

RAHMAN I, SKWARSKA E, MACNEE, W. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax.**1997. 52: 565–568.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M. L. G.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV patients. **Clinica Chimica Acta.** 1996. 255: 107-117.

REPINE, J. E.; BAST, A. A. L. T.; LANKHORST, I. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Am J Respir Crit Care Med.** 1997. v. 156. p. 341–357.

RICHARDS, G. A.; THERSON, A. J.; CAREL, A.; MERWE, V. D.; ANDERSON, R. Spirometric abnormalities in young smokers correlate with increased chemiluminiscence responses of activated blood phagocytes. **Am. Rev. Resp. Dis.** 1989. 139:181–187.

RUBIN, E. **Rubin - Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SCHOLS, A. M.; SLANGEN, J.; VOLOVICS, L.; WOUTERS, E. F. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med.** 1998. 157:1791-1797.

SCHOLS. A. M.; BUURMAN, W. A.; STAAL VAN DEN BREKEL, A. J. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax.** 1996. 51:819–824.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** 1968. 24;25(1):192-205.

SEM, C. K.; SIES, H.; BAURELE, P. A. Antioxidant and redox regulation of genes reactive oxygen species as costimulatory signal of cytokine-induced NFκB activation pathways. **Academic Press.** 2000. 181-198.

SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett.** 1979. 103(2):287-90.

SILVA, A. A. **Avaliação da técnica de biopsia pulmonar transtorácica em ovinos clinicamente sadios e os efeitos do procedimento sobre o metabolismo oxidativo.** 2009. 86p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

SKIPWORTH, R.J.E.; DAHELE, M.; FEARON, K.C.H. Diseases Associated with Cachexia: Cancer. In: HOFBAUER, K.G.; ANDKER, S.D.; INUI, A.; NICHOLSON, J.R. **Pharmactotherapy of Cachexia.** 2006. Boca Raton–FL: Taylor & Francis Group, p.117-142.

SNIDER, G. L.; LUCEY, E. C.; STONE, P. J. Animal models of emphysema. **Am Rev Respir Dis.** 1986. 133:149-69.

SNIDER, G. L. Emphysema: The first two centuries-and beyond: A historical overview, with suggestions for future research Part 2. **Am Rev Respir Dis.** 1992, 146:1615-1622.

STRYER, L. **Bioquímica.** Rio de Janeiro: Reverté, 1998.

SUPINSKI, G. S.; STOFAN, D.; NETHERY, D.; DIMARCO, A. D. Effect of free radical scavengers on diaphragmatic fatigue, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 55. 1997. 622-629.

TAKABATAKE, N.; NAKAMURA, H.; ABE, S. Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med.** 1999. 159:1215–1219.

TAKARO, T.; WHITE, S. M. Emphysema. **Am Rev Respir Dis.** 1973.108:334-7.

TEPPER, J.; PFEIFFER, J.; ALDRICH, M.; TUMAS, D.; KERN, J.; HOFFMAN, E. MCLENNAN, G.; HYDE, D. Can Retinoic Acid Ameliorate the Physiologic and Morphologic Effects of Elastase Instillation in the Rat? **Chest.** 2000.117:242-244.

TOTH, K. M.; CLIFFORD, D. P.; BERGER, E. M.; WHITE, C. W.; REPINE, J. E. Intact human erythrocyte prevents hydrogen peroxide mediated damage to isolated perfused rat lungs and cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. **J. Clin. Invest.** 1984. 74:292–295.

TSUKAGOSHI, H.; SHIMIZU, Y.; IWAMAE, S.; HISADA, T.; ISHIZUKA, K.; DOBASHI, K.; MORI, M. Evidence of oxidative stress in asthma and COPD: potential inhibitory effect of theophylline. **Respir Med.** 2000. 94: 584-588.

TURINO, G. M. The origins of a concept: the protease-antiprotease imbalance hypothesis. **Chest**. 2002. 122: 1958-60.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**. 2006. 160(1):1-40.

VAN ASBECK, B. S.; HOIDAL, J.; VERCELLOTTI, G. M.; SCHWARTZ, B. A.; MOLDOW, C. F.; JACOB, H. S. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. **Science**. 1985. 227:756–759.

VAN DE LEST, C. H. A.; VERSTEEG, E. M. M.; VEEKAMP, J. H.; VAN KUPPEVELT, T. H. Digestion of proteoglycans in porcine pancreatic elastase-induced emphysema in rats. **Eur. Respir. J**. 1995. 8, 238–245.

VAN HELVOORT, H. A. C.; HEIJDR, Y. F.; BOER, R. C. C; SWINKELS, A.; THIJS, H. M. H.; P. N.; DEKHUIJZEN, P. N. R. Exercise-induced systemic effects in muscle-wasted patients with COPD. **Med Sci Sports Exerc**. 2006. 38(9):1543-52.

VAN HELVOORT, H. A. C.; HEIJDR, Y. F.; BOER, R. C. C; SWINKELS, A.; THIJS, H. M. H.; P. N.; DEKHUIJZEN, P. N. R. Six-Minute Walking-Induced Systemic Inflammation and Oxidative Stress in Muscle-Wasted COPD Patients. **Chest**. 2007. 131 (2): 439-445.

ZOU, C. G.; AGAR, N. S.; JONES, G. L. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical inhibitor AAPH and its Inhibition by a commercial antioxidant mixture. **Life Science**. v. 69. 2001. p. 75-86.

WALSMITH, J.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. **International Journal of Cardiology**. 2002. v. 85, p. 89-99.

WEST, J. B. Doenças obstrutivas. In: Fisiopatologia pulmonar moderna. 4.ed. São Paulo: Manole, 1996, cap.4, p.57-86

WHITE. C. W.; REPINE, J. E. Pulmonary antioxidant defense mechanisms. **Exp Lung Res**. 1985; 8: 81–96.

WHITTON, F.; JOBIN, J.; SIMARD, P. M.; LEBLANC, P.; SIMARD, C.; BERNARD, S. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Med Sci Sports Exerc**. 1998 30(10):1467-74.

WILSON, J. R.; MANCINI, D. M. The mechanism of exertional fatigue in heart failure. **Cardioscience**.1990.1:13-7.

WOODS, K.; MARRONE, A.; SMITH, J. Programmed cell death and senescence in skeletal muscle stem cells. **Ann N Y Acad Sci**. 2000; 908: 331-335.

WOUTERS, E. F. M.; CREUTZBERG, E. C.; SCHOLS, A. M. W. J. Systemic Effects in COPD. **Chest**. 2002. 121:127-130.