

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM
PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR CRÔNICA OBSTRUTIVA (DPOC)
SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO AERÓBICO**

GREGORI DAS NEVES REINHARDT

Pelotas
2014

GREGORI DAS NEVES REINHARDT

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM
PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR CRÔNICA OBSTRUTIVA (DPOC)
SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO AERÓBICO**

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal
de Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a, Dra. Rejane Giacomelli Tavares

Pelotas
2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R369a Reinhardt, Gregori das Neves

Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes em pacientes com doença pulmonar crônica obstrutiva (dpc) submetidos ao exercício aeróbico / Gregori das Neves Reinhardt ; Rejane Giacomelli Tavares, orientadora. — Pelotas, 2014.

40 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Dpc. 2. Exercício físico. 3. Enzimas antioxidantes. I. Tavares, Rejane Giacomelli, orient. II. Título.

CDD : 572.4

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello

Ms. Pathise Souto Oliveira

Profa. Dra. Rejane Giacomelli Tavares (Orientadora)

Agradecimentos

AGRADEÇO, PRIMEIRAMENTE, A MINHA FAMÍLIA, POR TUDOS OS ENSINAMENTOS E ME AJUDAREM A FORMAR MEU CARATER. EM ESPECIAL MEU PAI MEU HEROI E EXEMPLO, MINHA MÃE PELO AMOR INCONDICIONAL E AO MEU IRMÃO MELHOR AMIGO E UNICO COMPANHEIRO ATE O FIM DA VIDA. TENHO MUITO ORGULHO DE TER NASCIDO NUMA FAMÍLIA DE PESSOAS TÃO HONESTAS, BATALHADORAS E DETERMINADAS. DEVO E DEDICO CADA UMA DAS MINHAS CONQUISTAS, PRINCIPALMENTE ESSA, A VOCÊS. AGRADEÇO A MINHA NAMORADA POR TODA A PACIENCIA COMPREENSÃO DA MINHA AUSENCIA NESSA RETA FINAL E PELO COMPANHEIRISMO SEMPRE.

A TODOS DO LABORATÓRIO DE BIOMARCADORES DA BIOQUIMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, QUE SEMPRE ME AJUDARAM E ME DERAM FORÇAS EM TUDO O QUE EU PRECISEI, ME ACALMANDO E DIVERTINDO NAS HORAS DE DESESPERO. AGRADEÇO A PATHISE FUTURA DOUTORANDA QUE SEMPRE ME AJUDOU NO LABORATORIO COM PACIENCIA E SABEDORIA SEM IGUAL.

AGRADEÇO A VANESSA MINHA PARCEIRA DE ESTAGIO POR OUVIR MEUS DEVANEIOS E TEORIAS MIRABOLANTES E POR TODOS OS MOMENTOS DIVERTIDOS, TENSOS, CANSATIVOS, DESESPERADORES.

UM AGRADECIMENTO ESPECIAL A FRACIELI, QUE ME ORIENTOU NOS MEUS PRIMEIROS PASSOS NESSE MUNDO LOUCO CHAMADO CIENCIA, A QUAL SEM ELA NÃO CONSEGUIRIA TER EMBASAMENTO PARA ESTE TRABALHO. NÃO TENHO PALAVRAS PRA AGRADECER TUDO O QUE ELA FEZ POR MIM NESSES ULTIMOS ANOS, SE MOSTRANDO DISPONÍVEL E PRONTA PRA ME AJUDAR SEMPRE.

A MINHA ORIENTADORA E AMIGA, PROF. DRA REJANE TAVARES, POR TER ME RECEBIDO DE BRAÇOS ABERTOS E TER ME DADO TODAS AS OPORTUNIDADES E ENSINAMENTOS AO LONGO DA MINHA INICIAÇÃO CIENTÍFICA, ESTGIO FINAL E TCC.

ÀS MINHAS AMIGAS E AMIGOS POR ESTAREM SEMPRE AO MEU LADO, ME INCENTIVANDO, DANDO FORÇA EM TODAS AS HORAS, E ENTENDENDO MINHAS AUSÊNCIAS E SURTOS, EM ESPECIAL LUCAS S. ARIEL R., EUARDO P., JULIANO L. E DIOGO G. SEM VOCÊS TUDO SERIA MAIS DIFÍCIL.

AOS MEUS COMPANHEIROS DE TIME DE FUTEBOL AMERICANO PELOTAS ANTS OBRIGADO POR ME MANTEREM EQUILIBRADO E DISCIPLINADO PERANTE SITUAÇÕES EXTREMAS.

E A 4ª TURMA DE BIOTECNOLOGIA, ATBIOTEC 2014 POR TUDO QUE VIVEMOS NESSES 4 ÚLTIMOS ANOS, EM ESPECIAL, DANIELE MASIERO, NATASHA OLIVEIRA, A. BRAM, A. SILVA, R. SCHUCH E HENRIQUE RAMOS QUE ESTIVERAM COMIGO DIARIAMENTE DURANTE TODA ESSA TRAJETÓRIA E QUE EU VOU LEVAR PRA SEMPRE. OBRIGADA POR TUDO, PRINCIPALMENTE PELA AMIZADE, QUE COM CERTEZA, NÃO FINALIZA COM O CURSO.

Resumo

REINHARDT, Gregori Neves **Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes em pacientes com doença pulmonar crônica obstrutiva (DPOC) submetidos ao exercício aeróbico.** Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença caracterizada pela obstrução crônica e não totalmente reversível do fluxo aéreo, decorrente principalmente do tabagismo (MARCHIORI, 2010). Além de acometer os pulmões, a DPOC é também acompanhada de manifestações sistêmicas que têm impacto direto sobre a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes, incluindo a disfunção dos músculos esqueléticos e intolerância ao exercício físico moderado e extremo (CAVALCANTE, 2009). Assim, o objetivo deste trabalho foi quantificar a atividade antioxidante em uma amostra de sangue de pacientes com DPOC, através da medida das atividades das enzimas Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR), antes e após o exercício físico supervisionado. Foram realizadas coletas de sangue no tempo Zero (basal) e tempo 1 (após o exercício), de 20 indivíduos, em duas consultas separadas por 21 dias. Nossos dados indicam que há diminuição significativa da atividade da CAT, após o exercício físico, nas duas consultas avaliadas, sem alteração das demais enzimas dosadas. Esta diminuição de atividade pode estar relacionada ou com o tabagismo (um dos principais causadores da patogênese) ou com uma adaptação fisiológica do organismo ao exercício. Entretanto, nossos resultados não são conclusivos, visto a necessidade de incluir estudos de expressão gênica para melhor envolvimento da fisiopatologia da doença.

Palavras-chave: DPOC; enzimas antioxidantes; exercício físico

Abstract

REINHARDT, Gregori Neves. **Evaluation of the activity of antioxidant enzymes in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) submitted to aerobic exercise.** Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease characterized by chronic and not fully reversible airflow obstruction, mainly due to smoking (Marchiori, 2010). Besides affecting the lungs, COPD is also accompanied by systemic manifestations that have direct impact on the quality of life and survival of patients, including dysfunction of skeletal muscles and intolerance to moderate exercise and extreme (CAVALCANTE, 2009). The objective of this study was to quantify the antioxidant activity in a blood sample of patients with COPD, by measuring the activities of enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), before and after supervised exercise. Blood samples were collected at time zero (baseline) and 1 time (after exercise) of 20 patients in two separate queries for 21 days. Our data indicate that there is a significant decrease in CAT activity after exercise, the two queries evaluated, no change of the other measured enzymes. This decrease in activity may be related or smoking (a major cause of pathogenesis) or a physiological adaptation of the body to exercise. However, our results are not conclusive, since the need to include gene expression studies to better involvement of the pathophysiology of the disease.

Keywords: COPD; antioxidants enzymes; physical exercise

Lista de Figuras

Figura 1	Formação de espécies reativas	20
Figura 2	Integração dos sistemas enzimáticos	23
Figura 3	Efeito que o exercício físico teve com relação à atividade das enzimas antioxidantes CAT eritrocitária, nas Consultas 1 e 2.	28
Figura 4	Efeito que o exercício físico teve com relação à atividade das enzimas antioxidantes SOD eritrocitária, nas Consultas 1 e 2.	29
Figura 5	Efeito que o exercício físico teve com relação à atividade das enzimas antioxidantes GPx eritrocitária nas consultas 1 e 2.	29
Figura 6	Efeito que o exercício físico teve com relação à atividade das enzimas antioxidantes GR eritrocitária, nas Consultas 1 e 2.	30

Lista de Tabelas

Tabela 1	Classificação da DPOC conforme a gravidade dos sintomas observados nos pacientes, segundo a Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.	17
----------	--	----

Lista de Abreviaturas

A1AT	Alfa-1-antitripsina
CAT	Catalase
CuZn SOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
CVF	Capacidade vital forçada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ER	Especies reativas
ERO	Especies reativas de oxigenio
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganes
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	Nicotiamida-adenina-dinucleótido-fosfato, forma reduzida
pH	Pontencial hidrogenionico
RL	Radicais livres
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
UV	Ultra violeta
VEF	Volume expiratorio forçado
VEF1	Volume expiratório forçado cronometrado de primeiro segundo

Sumário

1. Introdução	13
2. Revisão bibliográfica	15
2.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica (dpoc).....	15
2.2 Diagnostico e classificação.....	15
2.3 Dpoc e exercício físico.....	17
2.4 Radicais livres e estresse oxidativo.....	18
3. Objetivo	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. Materiais e métodos	25
4.1 Tipo de estudo.....	25
4.2 População em estudo.....	25
4.3 Protocolo de exercício físico e tempo.....	25
4.4 Amostras.....	25
4.5 Dosagens enzimaticas.....	26
4.5.1 Catalase.....	26
4.5.2 Superóxido dismutase.....	26
4.5.3 Glutaciona peroxidase.....	26
4.5.4 Glutaciona redutase.....	27
4.6 Dosagem de proteínas.....	27
4.7 Analise estatística.....	27
5. Resultados	28
6. Discussão	31
7. Conclusão	34
8. Referências	35

1. Introdução

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida como uma doença de limitação crônica do fluxo aéreo, que depois de instalada é tratável, porém irreversível (MARCHIORI, 2010). Constitui-se em um importante problema de saúde pública, pois é uma doença com alto nível de morbidade e mortalidade. Dentre os fatores causais, o principal é o tabagismo, que gera grandes limitações respiratórias. Por sua vez, a reabilitação pulmonar tem sido caracterizada como um programa individualizado e multidisciplinar, que procura devolver ao indivíduo parte da capacidade funcional permitida, melhorando sua limitação pulmonar e situação geral de vida. Ainda segundo as limitações respiratórias, a *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* classifica os pacientes com DPOC em quatro estágios, de acordo com a gravidade em que se encontra a doença. Ela acomete indivíduos com idade entornada de 40 anos sendo que cerca de 6% à 15% da população brasileira é possuída a doença segundo o ministério da saúde.

Como característica importante, pacientes que possuem essa patologia, ao realizarem exercícios físicos aumentam o consumo de oxigênio, ativando vias metabólicas específicas durante ou após o exercício. Como consequência da ativação destas vias, ocorre o aumento da produção de espécies oxidantes, denominadas de espécies reativas (ER) (ROWLANDS DS ET. AL, 2000;). Tais espécies estão aumentadas e são relacionadas com diversas patologias, como enfisema pulmonar, doenças inflamatórias, aterosclerose e câncer (SOUTHORN PA et al, 1988; DOURADO, 2006).

Com relação à prática contínua de exercícios físicos, estudos demonstram que esta é capaz de gerar adaptações em resposta a uma maior produção de radicais livres (RL). Diversos autores descrevem que a prática regular de exercício físico predominantemente aeróbico, com intensidade moderada, pode promover uma melhor resposta das defesas antioxidantes do organismo, mostrando-se benéfico para reduzir os danos causados pelas ER no organismo (SCHNEIDER, 2004)

Dessa forma, faz-se necessário buscar um maior entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DPOC, relacionando o efeito do exercício físico e o estresse oxidativo, na tentativa de esclarecer as alterações do balanço oxidante/antioxidante, observadas nos pacientes acometidos por essa patologia.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

DPOC é uma doença com repercussões sistêmicas, caracterizada por limitações do fluxo aéreo pulmonar, sendo parcialmente reversível, porém na maioria das vezes é progressiva. Tais limitações são causadas pela associação entre doença de pequenos brônquios e destruição de parênquima. A DPOC é um exemplo clássico de doença poligênica onde fatores genéticos e ambientais contribuem para seu desenvolvimento (LAIZO A, 2009).

Segundo a Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, dentre os principais fatores ambientais relacionados ao surgimento da patologia estão o tabagismo (cerca de 80 a 90% dos casos), poluição ambiental, nível socioeconômico, infecções respiratórias, dieta e poluição domiciliar. Dentre os fatores genéticos envolvidos na doença até o momento, aquele que está mais elucidado na literatura é a deficiência da alfa-1-antitripsina (A1AT), responsável por cerca de 1% dos casos de DPOC. A A1AT é uma glicoproteína de 41,622 Da, ela é produzida principalmente pelos hepatócitos, que liberam diariamente cerca de 2g da proteína na circulação (UNIPROT, 2014). Sua principal função é inibir a elastase neutrófila, uma protease de serina que tem a capacidade de hidrolisar as fibras de elastina no pulmão. Entretanto, devido as alterações da estrutura proteica causadas por mutações em seu gene, algumas vezes a proteína perde sua capacidade inibitória. A deficiência é refletida diretamente no pulmão, sob a forma de enfisema, bronquite crônica ou bronquectasia. (SANDFORD A.J et al. 2002).

2.2 Diagnostico e Classificação

Frequentemente a DPOC acomete indivíduos com idade em torno de 50 anos. Sintomas de tosse persistente podem ou não se acompanhar de

expectoração mucosa nos estágios iniciais. O quadro clínico pode se agravar quando o indivíduo é acometido por um episódio de infecção respiratória aguda, o que na maioria dos casos é acompanhado de dispneia. A falta de ar é um fator limitante no que tange a qualidade de vida, pois acaba dificultando ou até mesmo incapacitando o paciente de realizar atividades que exijam um mínimo de condicionamento físico para executá-las. A dispneia é geralmente progressiva com a evolução da doença. Na medida em que a doença progride, as exacerbações também se tornam mais frequentes. Com isso, os quadros de dispneia se tornam ainda mais constantes e incapacitantes, podendo serem acompanhados de hipoxemia, nos estados tardios da doença (II CONSENSO BRASILEIRO, 2004; MARCHIORI, 2010)

A classificação da gravidade da limitação das vias aéreas, na DPOC, é feita através de espirometria, utilizando a medida do volume expiratório forçado (VEF) após a administração de um bronco dilatador. Esta medida é expressa em percentual do previsto. Contudo, utiliza-se os valores pós-bronco dilatador da razão VEF/Capacidade vital forçada (CVF) para estabelecer a gravidade da limitação ao fluxo de ar (GOLD, 2014). A gravidade pode variar de leve, moderada, grave e muito grave, conforme demonstrada na tabela 1. Tal classificação é aceita e utilizada pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.

Tabela 1: Classificação da DPOC conforme a gravidade dos sintomas observados nos pacientes, segundo a Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.

Estagio 1	LEVE	*VEF1/**CVF < 0,70 e VEF1 ≥ 80% do previsto, tosse crônica e expectoração
Estagio 2	MODERADA	VEF1/CVF<0,70 e 50% ≤ VEF1<80% do previsto, piora dos sintomas.. Falta de ar tipicamente aos esforços físicos
Estagio 3	GRAVE	VEF1/CVF<0,70 e 30% ≤ VEF1 <50% do previsto, piora dos sintomas, exacerbações frequentes com impacto na qualidade de vida
Estagio 4	MUITO GRAVE	VEF1/CVF < 0,70 e VEF1 < 30% do previsto mais a insuficiência respiratória crônica

* Capacidade Vital Forçada (CVF), **Volume Expiratório Forçado no Primeiro segundo (VEF1). Fonte: adaptada do GOLD (<http://www.goldcopd.com/>)

2.3 DPOC e Exercício Físico

Indivíduos com DPOC possuem um baixo rendimento nas atividades físicas em pacientes com DPOC são estipuladas devido às limitações do sistema ventilatório e na troca gasosa que a doença causa. Entretanto, estudos recentes demonstram que não são apenas estes os motivos (LAIZO A, 2009; WUST R.C.I, 2008; SILVA K.R, 2008; ROCETO L.S, 2007). Fatores como a disfunção da musculatura periférica, anormalidades estruturais, redução da massa muscular e redução da relação capilaridade/mitocôndria parecem estar envolvidas. Ainda, em função da diminuição da circulação, ocorre dificuldade na perfusão do oxigênio pelos tecidos, com alterações no tamanho das fibras musculares e redução das enzimas oxidativas (DOURADO et al, 2011). Outras anormalidades funcionais e alterações bioenergéticas musculares, como a redução no consumo de oxigênio e aumento do nível de lactato (com

diminuição do pH) também estão relacionadas com o menor rendimento destes pacientes em atividades físicas (DOURADO et al, 2011).

Os exercícios cardiovasculares possuem interferência positiva e reabilitadora nos fatores limitantes dos pacientes com doenças pulmonares. Estes ajudam no controle das condições de estabilidade do paciente, podendo modificar suas atividades de vida diária e diminuindo suas restrições físicas (BOURJEILY, G et al. 2000 ; COOPER, C.B, 2001).

Como uma resultante deste processo de diminuição da atividade física, muitas vezes nota-se a diferença entre os músculos dos membros superiores e inferiores. A fraqueza da musculatura dos membros inferiores acontece devido à diminuição perceptível da área transversa da coxa. A debilitação da musculatura dos músculos inferiores em pacientes com DPOC é explicada pela diminuição das atividades diárias como a caminhadas, com o intuito de evitar o desconforto da dispneia (SILVA KR ET. AL 2008; MARCHIORI, 2010; II CONSENSO BRASILEIRO, 2011). O quadro se agrava ainda mais com pacientes DPOC fumantes, visto que a musculatura do tabagista é mais fatigável, o que acarreta na aceleração dos sintomas descritos anteriormente (WUST R.C.I et al, 2008)

O exercício físico é o método mais eficiente para aumentar a quantidade endógena de antioxidantes, pois ele induz o estresse oxidativo propriamente dito, o que faz com que gradativamente, ocorra a estimulação dos mecanismos antioxidantes que conseqüentemente aumentaria a resistência a lesões induzidas pelo exercício. A maior parte dos efeitos benéficos decorrentes do exercício físico é devido, principalmente, às adaptações induzidas sobre os diversos sistemas fisiológicos, tais como o sistema antioxidante (CRUZAT, 2007).

2.4 Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Os RL são definidos como qualquer elemento químico com elétrons desemparelhados em sua camada orbital mais externa. Os RL são extremamente reativos e iniciam reações em cadeia, pois retiram um elétron de uma molécula das proximidades para que possam completar seus próprios orbitais a fim de se estabilizarem eletronicamente de acordo com a regra do octeto. Dentre os radicais mais comumente produzidos encontramos o ânion superóxido, radical peroxila, radical hidroxila, radical alcoxila, bem como o óxido nítrico (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). No entanto, existem espécies equitativamente reativas, porém que não possuem elétrons desemparelhados na sua última camada. Mesmo sem a presença do elétron desemparelhado, sua atuação no sistema biológico pode ser tão prejudicial quanto a dos RL. Estes são então classificados como espécies reativas (ER). A nomenclatura espécies reativas de oxigênio (ERO) é tradicionalmente usada para incluir tanto radicais quanto não radicais contendo moléculas de oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

As ERO são geradas constantemente no metabolismo, principalmente na cadeia respiratória mitocondrial, sendo que cerca de 2-5% do oxigênio consumido são convertidos nessas espécies. Ainda, são formadas de forma deliberada no processo inflamatório, pela exposição solar (UV), drogas, radiação ionizante, poluentes do ar e outras substâncias químicas (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007; HALLIWELL, 2011; COSTA, 2013) (Figura1).

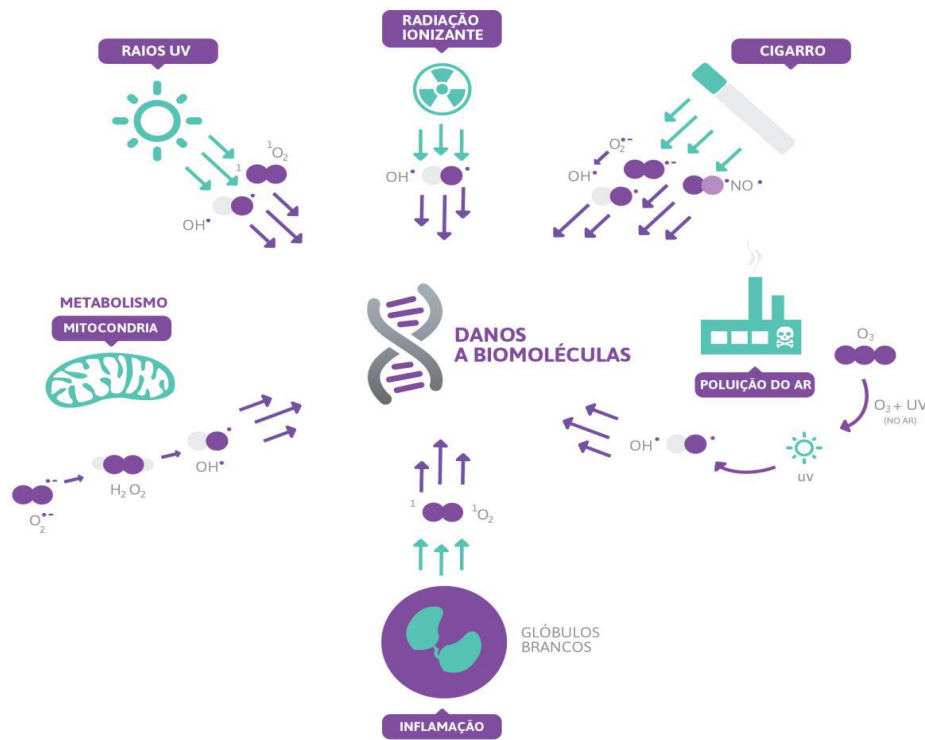


Figura 1- Formação de espécies reativas (COSTA, 2013)

As ER desempenham um papel importante na sinalização celular, na regulação de proteínas, em processos fagocitários e na resposta imunológica. Porém, quando há uma produção excessiva de ERO, tornam-se extremamente perigosas ao organismo, já que são altamente reativas, o que pode acarretar em reações em cadeia. Elas podem oxidar diversas biomoléculas, como proteínas, lipídeos e DNA. Assim, as ERO, de certa forma, constituem-se em um paradoxo, pois ao mesmo tempo que geram e sustentam a vida, podem, ser letais. Existem evidências de que as ERO podem estar envolvidas direta ou indiretamente às patogênese como inflamações pulmonares, disfunção hepática e carcinogênese, podendo ainda causar danos ou apoptose celular. (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007; ELLAH, 2011;).

A fim de promover a manutenção dos níveis de ERO e a proteção celular dos efeitos nocivos dessas espécies, o nosso organismo apresenta mecanismos de defesa antioxidante. Estes mecanismos protegem os tecidos e líquidos corpóreos da lesão causada pelos oxidantes, seja daqueles produzidos

pelo metabolismo normal ou pela resposta à inflamação e às doenças. Dessa forma, os antioxidantes agem como agentes protetores da oxidação de biomoléculas e impedem que a reação em cadeia se propague. Usualmente, esse sistema pode ser dividido em enzimático (figura 2) e não enzimático. (CAVALCANTE, 2009)

No sistema de defesa não enzimático utilizam-se diferentes estratégias de proteção do organismo, sendo compostos que possuem capacidade de neutralizar a ação das ERO. Este sistema inclui a glutatona (GSH) como principal composto antioxidante intracelular. Além da glutatona, vitaminas como o α -tocoferol e o ácido ascórbico, polifenóis, melatonina, bilirrubina, urato e ácido lipóico também são elencados nesta classe (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Cabe destacar que grande parte destes compostos podem ser de origem endógena ou dietética (KOURY & DONANGELO, 2003; HALLIWELL & WHITEMAN, 2004; SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011).

Como parte do sistema de defesa enzimático pode-se citar as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), além da glutatona redutase (GR) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A enzima SOD catalisa a dismutação de dois radicais superóxido, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Ela é a enzima mais abundante do organismo, sendo a quinta proteína mais abundante no organismo, sendo considerada a primeira linha de defesa do nosso organismo. Existem duas isoformas principais da SOD, uma citoplasmática, CuZnSOD e outra, mitocondrial, MnSOD. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; ZLATKOVIĆ et al, 2011).

Já as enzimas CAT e GPx atuam juntamente com a SOD, na articulação desse sistema de defesa, fazendo com que seja impedido o acúmulo de peróxido de hidrogênio. A CAT atua diretamente na redução do H_2O_2 em água, como forma de prevenção da formação do radical hidroxila. Possui afinidade somente por moléculas de baixo peso molecular, não sendo capaz de metabolizar moléculas maiores como os peróxidos lipídicos. Ela é encontrada em maior abundância nos tecidos com grande quantidade de peroxissomos, como no fígado, mas também pode ser encontradas em menor quantidade no

citosol e na fração microsomal da célula (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Também para a remoção do peróxido de hidrogênio é utilizada a enzima GPx, utilizando GSH como fonte redutora. A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular, que possui na sua estrutura os aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. Por ser um quelante de radicais livres, podem reagir e agir direta ou indiretamente como cofator das enzimas antioxidantes como por exemplo a GPx e a GR, entre outras (FERREIRA I. et al. 2007). A GPx é encontrada nas membranas celulares e está presente em grande quantidade no fígado, funcionando como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, através da conversão de glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG). Neste processo redox, ocorre a remoção do peróxido de hidrogênio e formação de água (SCHNEIDER C. D et al, 2004; FERREIRA I. et al. 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A glutathiona redutase (GR) é uma flavoproteína dependente de NADPH e da integridade da via das pentoses. É a enzima necessária para manter a glutathiona em sua forma reduzida e, possivelmente, para controlar o estado redox de NADP em tecidos onde GSSG está disponível (PINTO, R. E et al, 1969 suplemento, 2001). A recuperação de GSH por GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, já que as baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo. (SCHAFER, F et al 2001; FERREIRA I. et al. 2007).

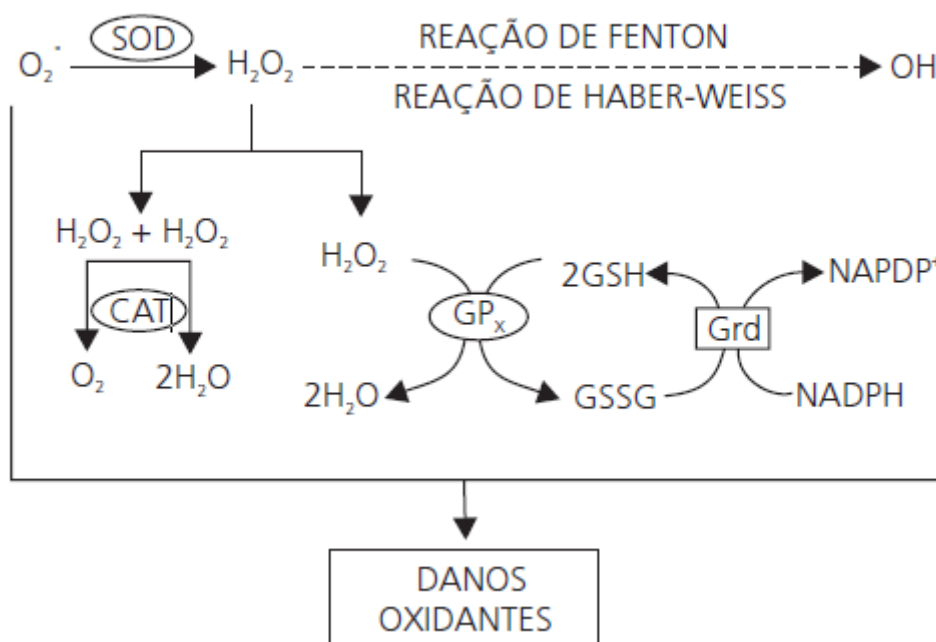


Figura 2: Integração dos sistemas enzimáticos (BARBOSA, 2010).

Normalmente o organismo tenta manter o equilíbrio entre a produção de ERO e os sistemas de defesas antioxidantes (DROGE, 2002). Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da alta geração de ERO ou em detrimento da velocidade de remoção desses, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo, que irá causar danos a biomoléculas, lipídeos, proteínas e DNA (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a resposta das enzimas antioxidante em pacientes com DPOC moderada submetidos ao exercício físico supervisionado.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do exercício físico na atividade da enzima CAT, em eritrócitos.
- Avaliar o efeito do exercício físico na atividade da enzima SOD, em eritrócitos.
- Avaliar o efeito do exercício físico na atividade da enzima GPX, em eritrócitos.
- Avaliar o efeito do exercício físico na atividade da enzima GR, em plasma.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Estudo randomizado, aberto e cruzado.

4.2 População em estudo

Foram incluídos neste estudo 20 sujeitos diagnosticados com DPOC moderada, em tratamento, e fora de crises de exacerbação, sendo 11 homens e 9 mulheres. O grupo possuía idade média de 61,5 anos com variação de 10,2 anos para mais ou para menos. Em relação ao tabagismo, 35% são fumantes ativos e 65% ex-fumantes. Todos os pacientes recrutados assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

4.3 Protocolo de exercício físico e tempo

Foram realizados testes de exercício cardiorrespiratório de carga constante, em cicloergômetro. Cada sujeito teve sua capacidade individual verificada através da determinação do seu tempo máximo de capacidade de exercício. As coletas de amostras foram realizadas sempre em dois tempos: antes do exercício (tempo basal=tempo zero) e no tempo máximo de tolerância, sendo este variável, conforme a capacidade de cada um dos participantes (tempo 1). Para padronizar o tempo 1, ficou definido a utilização do termo isotempo, que se refere ao limite máximo de tolerância de cada indivíduo, independentemente do tempo em minutos.

4.4 Amostras

Foram coletadas amostras de sangue total através de punção venosa para obtenção de soro, plasma e eritrócito hemolisado . As amostras foram obtidas em duas consultas separadas, com um intervalo de 21 dias entre elas.

4.5 Dosagens Enzimáticas

4.5.1 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada de acordo com AEBI (1984), sendo diretamente proporcional à taxa de decomposição do H_2O_2 . Sendo assim, sua atividade pode ser medida através da avaliação do consumo do H_2O_2 . Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 240nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. A atividade foi expressa em unidades de CAT por miligrama de proteína.

4.5.2 Glutationa Peroxidase (GPX)

A atividade da GPx foi avaliada segundo o protocolo de kit Randox (Ransel®). O teste é baseado no consumo de NADPH, seguindo o princípio de que a GPx catalisa a oxidação da glutatona por hidroperóxido de cumeno. Na presença de GR e NADPH, a GSSG é imediatamente convertido para a forma reduzida com um concomitante oxidação de NADPH a $NADP^+$. Foram pipetados nos tubos 10 μ L de amostra (hemolisado), 500 μ L de reagente R1 da Randox e 20 μ L de Cumeno R2 da Randox. Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 340nm.

4.5.3 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada de acordo com Misra & Fridovich (1972) Tem como princípio a inibição da auto oxidação da adrenalina pela SOD presente na amostra biológica. Para realização do teste, foi utilizado tampão glicina 50mM, adrenalina 60mM e CAT 10 μ M. Adicionou-se 5 μ l de hemolisado (amostra). A reação foi disparada com 10 μ l da solução de adrenalina, foram determinadas absorbâncias no comprimento de onda de 480nm.

4.5.4 Glutathione Redutase (GR)

A atividade da GR foi avaliada segundo o protocolo de kit Randox (Ransel ®). A GR catalisa a redução da glutathione na presença de NADPH, o qual é oxidado para NADP⁺. Isso ocorre porque ao utilizar o substrato GSSG, a enzima consome NADPH. Este consumo é acompanhado em 340nm, expressando a atividade enzimática. Para este teste, utilizou-se como amostras de plasma.

4.6 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada segundo método de Lowry et al (1951),utilizando albumina como padrão

4.7 Analise Estatística

Para análise estatística foi utilizado Teste t pareado utilizando o programa Graph Pad Prism 5.0. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p \leq 0,05$.

5. Resultados

Nós investigamos o efeito que o exercício físico teve com relação à atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx e GR em pacientes DPOC. Ao avaliarmos a atividade da CAT (figura 3), podemos observar que houve diminuição significativa desta atividade no tempo 1 (isotempo) onde $p=0,0410$, quando comparado com o tempo basal onde $p=0,0484$, tanto na consulta inicial quanto na consulta 21 dias após. Em relação às outras enzimas (SOD, GPx e GR), as análises também foram realizadas utilizando-se comparação entre tempo basal e isotempo, nas duas consultas separadas. Não foi observada diferença significativa para a atividade da SOD (figura 4), GPx (figura 5) e GR (figuras 6).

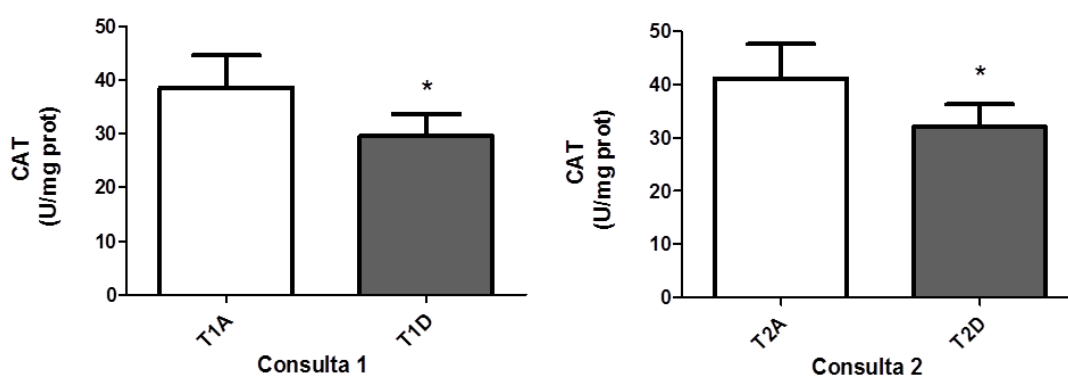


Figura 3- Efeito que o exercício físico teve com relação à atividade das enzimas antioxidantes CAT eritrocitária em amostras de pacientes com DPOC moderada, na consulta 1 $p=0,0410$ e consulta 2 $p=0,0484$; $N=20$; Utilizou-se Teste t pareado ($p \leq 0,05$)

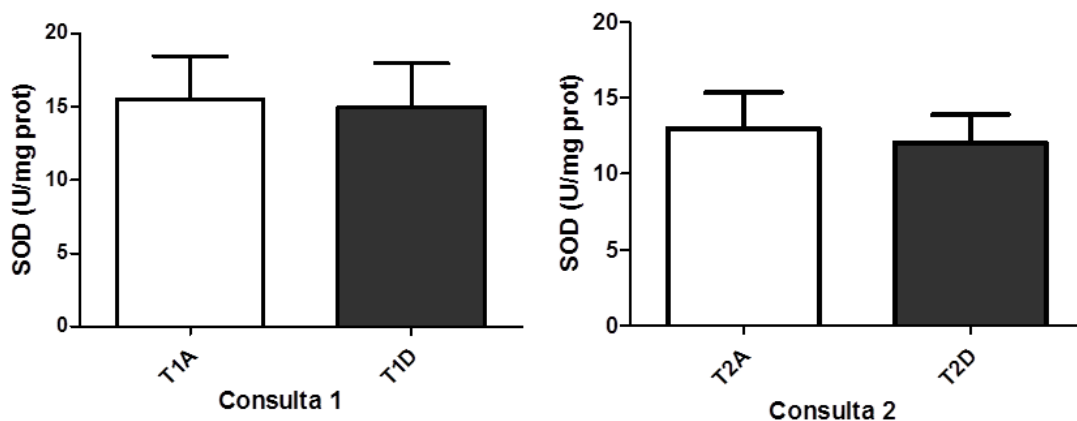


Figura 4- Efeito que o exercício físico teve com relação à atividade das enzimas antioxidantes SOD eritrocitária em amostras de pacientes com DPOC moderada, na consulta 1 $p=0,1848$ e consulta 2 $p=0,3255$; $N=20$; Utilizou-se Teste t pareado ($p \leq 0,05$)

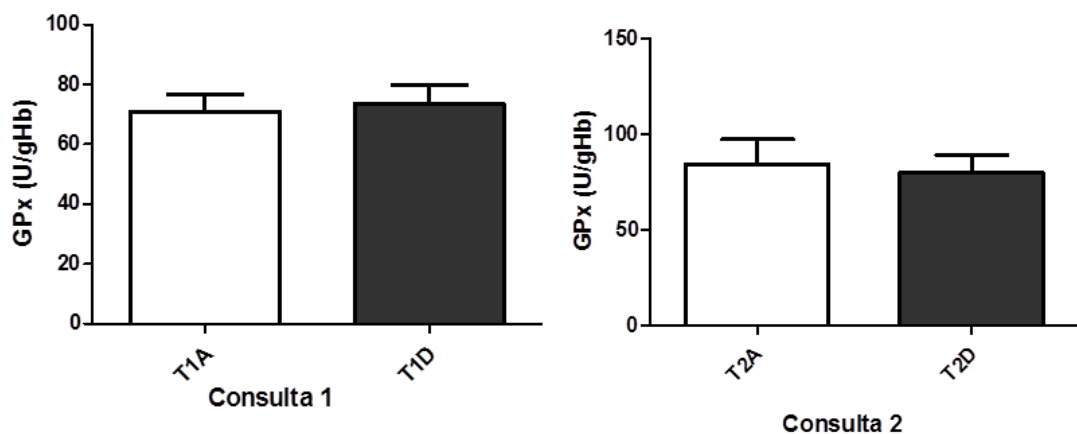


Figura 5- Efeito que o exercício físico teve com relação à atividade das enzimas antioxidantes GPx eritrocitária em amostras de pacientes com DPOC moderada, na consulta 1 $p=0,4265$ e consulta 2 $p=0,5398$; $N=20$; Utilizou-se Teste t pareado ($p \leq 0,05$)

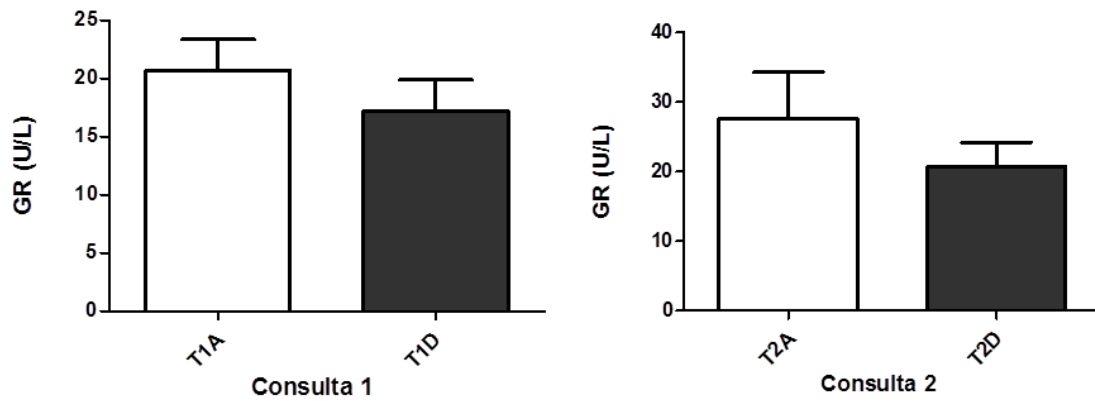


Figura 6- Efeito que o exercício físico teve com relação à atividade das enzimas antioxidantes GR eritrocitária em amostras de pacientes com DPOC moderada, na consulta 1 $p=0,4662$ e consulta 2 $p=0,2160$; $N=20$; Utilizou-se Teste t pareado ($p \leq 0,05$)

6. DISCUSSÃO

O balanço Oxidativo/Antioxidativo durante o exercício físico tem sido alvo de muitos estudos ao longo dos últimos anos (BEJMA et al., 1999; RADÁK et al., 1999; ALESSIO et al., 2000). A medida da atividade de enzimas antioxidantes é de extrema importância para o melhor entendimento deste equilíbrio. Nesse estudo constitui-se na comparação entre um grupo de pacientes com DPOC, antes e após uma sessão de exercícios físicos acompanhados, e em duas consultas separadas por 21 dias. A importância da realização de atividades físicas neste grupo de pacientes, mesmo com limitações, o entendimento obtido foi que parece estar relacionada não somente ao aumento da capacidade cardiorrespiratória, mas também com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, GR e GPx. Estas observações foram obtidas em pacientes com DPOC que realizavam a musculação resistida, com pesos variados (JI & FU, 1992; MARGARITIS et al, 1997).

O estresse oxidativo acontece quando há uma falta de equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de antioxidantes, levando a danos celulares. Tal desequilíbrio ocorre pela elevada produção de radicais livres, pela diminuição dos antioxidantes ou por ambos os processos simultaneamente (RAMOS, 2000).

Também foi demonstrado que a atividade da enzima antioxidante GPX nos eritrócitos aumenta proporcionalmente com o aumento do volume máximo de oxigênio absorvido do ar que está dentro dos pulmões, aumentando assim a produção de energia e protegendo o organismo do dano à membrana celular. (JI & FU, 1922; MARGARITIS et al, 1997). Já Leeuwenburgh e colaboradores (1997) complementam que o estresse oxidativo induzido pelo exercício pode disparar adaptações em resposta ao treinamento e que tais adaptações seriam tecido específicas, sugerindo um mecanismo regulatório complexo. Além disso, outro estudo propõe que, em indivíduos saudáveis, o exercício físico induz a peroxidação lipídica transitoriamente, e que existe remoção dos produtos da lipoperoxidação durante a fase de recuperação (LEAF D. A et al., 1997).

Em nosso trabalho foram investigados somente os marcadores antioxidantes, onde se verificou somente diminuição na atividade da CAT, porem nenhuma modificação nas enzimas GPx, SOD e GR foram observadas. Corroborando com o nosso estudo, De Castro (2003) verificou que a atividade da CAT pode ser diminuídas em resposta à exercícios de diferentes intensidades, afirmando que não somente exercícios de carga pesada ou prolongados exigem resposta do sistema antioxidante. Ainda em seu estudo, o pesquisador verificou e comparou a produção de ERO e a atividade da CAT nos exercícios com intensidades baixa, média e alta intensidade, com duração de 20 minutos. Foi demonstrado que existe uma relação direta entre a atividade da CAT e a diminuição quantitativa no plasma coletado entre as fases pré e pós-exercício, permitindo concluir que quanto maior a sua ação, maior será a queda nos valores plasmáticos. (DE CASTRO, 2003)

Também em relação à diminuição da atividade da CAT nos tempos pós-exercício, um elegante trabalho investigou a ação da fumaça de cigarros e sua relação com a expressão de proteínas. Sundar e colaboradores (2013), a fumaça do cigarro teria interferência direta na diminuição da expressão de Sirtuínas, especialmente da sirtuína 1 (SIRT-1), o que levaria à uma diminuição na expressão de enzimas antioxidantes SOD e CAT. A SIRT-1 é uma histona deacetilase pertencente à classe III, que possui atividade anti-inflamatória, antienvhecimento, inibição da senescência e anti-apoptótica. Sua ação se dá devido à sua capacidade para desacetilar ambas as histonas e proteínas, incluindo a transcrição de fatores como, NF- κ B, FOXO3, P53. A diminuição da SIRT1 promove um aumento da acetilação do gene da FOXO3. Este gene possui um papel regulador na resposta inflamatória pulmonar e regulação da expressão de genes antioxidantes, codificadores da expressão das proteínas enzimáticas SOD e CAT (SUNDAR, 2013). Com base neste estudo, a diminuição da atividade da CAT verifica em nosso estudo pode ser uma consequência direta do tabagismo nas pessoas incluídas no estudo. Neste sentido, é importante destacar que outro estudo realizado em nosso grupo, com uso de grupo controle saudável, já havia demonstrado diminuição da capacidade antioxidante do grupo DPOC. Pode-se sugerir, desta forma que o

resultado da atividade da CAT aqui demonstrado seja decorrente do uso do cigarro e de seus malefícios já tão comprovados.

7. Conclusão

DE acordo com nossos resultados pode-se concluir desta forma, que a atividade física contínua diminui a atividade da enzima CAT, sem afetar as demais enzimas antioxidantes em pacientes com DPOC moderada. Entretanto, nossos resultados não são conclusivos, visto a necessidade de incluir estudos de expressão gênica para melhor entendimento da fisiopatologia da doença.

8. Referências

AEBI H. CATALASE IN VITRO. METH ENZYMOL, v 105: p.121–126, 1984

ALESSIO, Helaine M. et al. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 32, n. 9, p. 1576-1581, 2000.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios; Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BEJMA, Jeff; JI, Li Li. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 1, p. 465-470, 1999.

BOURJEILY, Ghada; ROCHESTER, Carolyn L. Exercise training in chronic obstructive pulmonary disease. **Clinics in chest medicine**, v. 21, n. 4, p. 763-781, 2000.

COOPER, Christopher B. Exercise in chronic pulmonary disease: aerobic exercise prescription. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, n. 7 Suppl, p. S671-9, 2001.

COSTA, Marcelo Zanusso et al. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 384, n. 1-2, p. 21-28, 2013.

DE CASTRO, Marineis Aparecida Curione. **Estudo Comparativo da Produção de Radicais Livres e Catalase nos Exercícios de Intensidade e Duração Moderadas**. 2003. Tese de Doutorado. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Educação Física da Universidade

Católica de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Educação Física.

DE MATOS CAVALCANTE, Antonio George; DE BRUIN, Pedro Felipe Carvalhedo. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.

CRUZAT, Vinicius Fernandes et al. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 5, p. 336-42, 2007.

DOURADO, Victor Zuniga et al. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 2, p. 161-71, 2006.

DOURADO, Victor Zuniga; GODOY, Irma. Recondicionamento muscular na DPOC: principais intervenções e novas tendências. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, p. 331-334, 2004.

DOURADO, Victor Zuniga; VIDOTTO, Milena Carlos; GUERRA, R. L. Equações de referência para os testes de caminhada de campo em adultos saudáveis. **J Bras Pneumol**, v. 37, n. 5, p. 607-14, 2011.

DOURADO, Victor Zuniga. Reference equations for the 6-minute walk test in healthy individuals. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 96, n. 6, p. e128-e138, 2011.

DOURADO, Victor Zuniga et al. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 2, p. 161-71, 2006.

DRÖGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

ELLAH, Abd; RUSHDI, Mahmoud. The role of liver biopsy in detection of hepatic oxidative stress. **Veterinary medicine international**, v. 2011, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, Isabel CFR; ABREU, Rui. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. **Free radicals in biology and medicine**, v. 3, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free radical in biology and medicine, 3RD ED., oxford university press: oxford, 2002; 4THED., 2007

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

II CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÓNICA – DPOC – 2004. J BRASPNEUMOL; v 30, suplemento 5, p. 6-41, 2004.

Jl, Li Li; FU, Ronggen. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. **J Appl Physiol**, v. 72, n. 2, p. 549-554, 1992.

KOURY, Josely Correa; DONANGELO, Carmen Mariano. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

LAIZO, Artur. Doença pulmonar obstrutiva crônica: Uma revisão. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 15, n. 6, p. 1157-1166, 2009.

LEAF, DAVID A. et al. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 29, n. 8, p. 1036-1039, 1997.

LEEUWENBURGH, CHRISTIAAN et al. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 41, n. 1, p. R363, 1997.

LOWRY, O.H, ROSEBROUGH N.J, FARR AL AND RANDALL R.J. J. BIOL. CHEM. v. 193, p. 265-275, 1951

MARCHIORI, Roseane Cardoso et al. Diagnóstico e tratamento da DPOC exacerbada na emergência. **Rev AMRIGS**, v. 54, n. 2, p. 214-23, 2010.

MARGARITIS, I. et al. No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. **International journal of sports medicine**, v. 18, n. 03, p. 186-190, 1997.

MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

PINTO, R. E, BARTLEY W, BIOCHEM. J. 1969, 11, 67. Prolonged intermittent shuttle-running following acute vitamin c supplementation. **Int J Sports Med**. Jan; 22(1): p. 68-75, 2001

RAHMAN, Irfan; BISWAS, Saibal K.; KODE, Aruna. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European journal of pharmacology**, v. 533, n. 1, p. 222-239, 2006.

RAMOS, G.; ALVES, A. & HERMES LIMA, M. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. In: NINÕ EL-HANI, C. & VIDEIRA, A. A. P. O que é vida. Para entender a biologia do século XXI. Rio de Janeiro: Relumê Dumará, 2000

ROCETO, Lúgia dos S. et al. Eficácia da reabilitação pulmonar uma vez na semana em portadores de doença pulmonar obstrutiva. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 6, p. 475-80, 2007.

ROWLANDS, D. S.; DOWNEY, B. Physiology of triathlon. **Exercise and sport science. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**, p. 921-2, 2000.

SANDFORD, A. J.; SILVERMAN, E. K. Chronic obstructive pulmonary disease• 1: Susceptibility factors for COPD the genotype–environment interaction. **Thorax**, v. 57, n. 8, p. 736-741, 2002.

SCHAFER, Freya Q.; BUETTNER, Garry R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SCHNEIDER, Cláudia Dornelles; OLIVEIRA, AR de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-13, 2004.

SILVA, K. R. et al. Fraqueza muscular esquelética e intolerância ao exercício em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica; Skeletal muscle weakness and exercise intolerance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Braz. J. Phys. Ther.(Impr.)**, v. 12, n. 3, p. 169-175, 2008.

SMITH, C.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica De Marks**. PORTO ALEGRE: ARTMED. p. 980, 2007

SOUTHORN, Peter A.; POWIS, Garth. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 1988. p. 390-408.

SREEKUMAR, Parameswaran G.; HINTON, David R.; KANNAN, Ram. Methionine sulfoxide reductase A: Structure, function and role in ocular pathology. **World journal of biological chemistry**, v. 2, n. 8, p. 184, 2011.

SUNDAR, Isaac K.; YAO, Hongwei; RAHMAN, Irfan. Oxidative stress and chromatin remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and smoking-related diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 15, p. 1956-1971, 2013.

WÜST, Rob CI et al. Skeletal muscle properties and fatigue resistance in relation to smoking history. **European journal of applied physiology**, v. 104, n. 1, p. 103-110, 2008.

ZLATKOVIĆ, Jelena; FILIPOVIĆ, Dragana. Stress-induced alternations in CuZnSOD and MnSOD activity in cellular compartments of rat liver. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 357, n. 1-2, p. 143-150, 2011.