

O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas*

The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives

Antonio George de Matos Cavalcante, Pedro Felipe Carvalhede de Bruin

Resumo

A DPOC é uma causa importante de morbidade e mortalidade em escala global. As manifestações clínicas e funcionais da DPOC resultam de danos pulmonares provocados por um conjunto de mecanismos, incluindo o estresse oxidativo, a inflamação, o desequilíbrio do sistema protease-antiprotease e a apoptose. O estresse oxidativo é central na gênese da DPOC, pois além de provocar dano direto às estruturas pulmonares, amplifica os demais mecanismos. Os eventos celulares e moleculares responsáveis pelo dano pulmonar antecedem em muito a expressão clínica e funcional da DPOC. Os broncodilatadores, principais drogas empregadas atualmente no tratamento da DPOC, não são eficazes em reduzir a progressão da doença. Avanços na compreensão da patogênese da DPOC aliados a esforços renovados na pesquisa básica e clínica deverão permitir sua detecção na fase pré-clínica e possibilitar um monitoramento mais adequado de sua atividade, além de permitir a introdução de novas modalidades de agentes terapêuticos capazes de impedir eficazmente sua progressão.

Descritores: Doença pulmonar obstrutiva crônica; Estresse oxidativo; Oxidantes; Antioxidantes; Inflamação.

Abstract

Worldwide, COPD is a major cause of morbidity and mortality. The clinical and functional manifestations of COPD result from lung injury occurring through various mechanisms, including oxidative stress, inflammation, protease-antiprotease imbalance and apoptosis. Oxidative stress is central to the pathogenesis of COPD, since it can directly damage lung structures and exacerbate the other mechanisms involved. The cellular and molecular events involved in such lung injury are believed to occur long before the clinical and functional expression of COPD. Although the use of bronchodilators is currently the principal treatment for COPD, bronchodilators have little or no effect on disease progression. A better understanding of the pathogenesis of COPD, together with renewed efforts in basic and clinical research, will allow the diagnosis of COPD at a pre-clinical stage and provide more appropriate monitoring of disease activity, as well as leading to the development of novel therapeutic agents that will effectively prevent the progression of the disease.

Keywords: Pulmonary disease, chronic obstructive; Oxidative stress; Oxidants; Antioxidants; Inflammation.

Introdução

A DPOC é um problema de saúde global, com graves repercussões econômicas e sociais, além de constituir-se, no plano individual, uma causa importante de incapacidade e de baixa qualidade de vida dos pacientes e de seus cuidadores.^(1,2) De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80 milhões de pessoas sofrem de DPOC moderada ou grave.⁽³⁾ No Brasil, a prevalência

em grandes centros urbanos, como a cidade de São Paulo, varia de 6% a mais de 15%, dependendo do critério diagnóstico adotado.⁽⁴⁾ A DPOC representa a quinta principal causa de morte no mundo e, de acordo com estimativas recentes, alcançará a terceira posição até o ano de 2030.⁽³⁾ O incremento na taxa de mortalidade da DPOC contrasta com a expressiva redução observada

* Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Departamento de Medicina Clínica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE) Brasil.

Endereço para correspondência: Pedro Felipe Carvalhede de Bruin. Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Ceará, Rua Prof. Costa Mendes, 1608, 4º andar, CEP 60430-140, Fortaleza, CE, Brasil.

Tel 55 85 3366-8052. E-mail: pfelipe@superig.com.br

Apoio financeiro: Nenhum.

Recebido para publicação em 2/7/2009. Aprovado, após revisão, em 18/8/2009.

em outras enfermidades, tais como câncer, doença coronariana, acidente vascular cerebral e AIDS. Essa redução é atribuída, em grande parte, a uma maior eficácia no diagnóstico e no tratamento dessas condições, parcialmente decorrente de avanços na compreensão dos seus mecanismos etiopatogênicos.

A DPOC tem sido definida classicamente como uma redução crônica e progressiva do fluxo aéreo, secundária a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos. Essa inflamação produz alterações de intensidade variável nos brônquios (bronquite crônica), bronquíolos (bronquiolite obstrutiva) e/ou parênquima pulmonar (enfisema).^(5,6) Além de acometer os pulmões, a DPOC é também acompanhada de manifestações sistêmicas que têm repercussão importante sobre a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes, incluindo a depleção nutricional e a disfunção dos músculos esqueléticos, o que contribui para a intolerância ao exercício.⁽⁷⁾

Os termos inflamação e redução do fluxo aéreo são centrais para a definição da DPOC, assim como da asma, embora diferenças marcantes entre essas duas condições devam ser reconhecidas. A inflamação na DPOC tem um padrão celular e de mediadores diferente do padrão observado na asma e apresenta, na maioria dos casos, resposta pouco expressiva aos esteroides.^(8,9) Ademais, a redução do fluxo aéreo na DPOC tem um importante componente irreversível, secundário a alterações estruturais das vias aéreas, tais como a fibrose peribronquiolar e o aumento da colapsabilidade decorrente da destruição das fibras elásticas do tecido pulmonar. Essas alterações são provocadas por um complexo mecanismo iniciado bem antes das primeiras manifestações clínicas e funcionais.⁽¹⁰⁾ Desse modo, uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na aparentemente complexa etiopatogenia da DPOC permitirá não somente um diagnóstico mais precoce, como poderá levar à introdução de agentes terapêuticos que modifiquem favoravelmente o curso da doença antes do desenvolvimento das alterações estruturais permanentes.

De maneira geral, quatro mecanismos principais são responsáveis pelas alterações observadas na DPOC: o estresse oxidativo, a inflamação, o

desequilíbrio do sistema protease-antiprotease e a apoptose.⁽¹⁰⁾ A contribuição relativa de cada um desses mecanismos é variável e, possivelmente, explica as diferentes formas de apresentação da doença. Tem sido atribuído ao estresse oxidativo um papel central na gênese da DPOC, pois além da injúria direta sobre o trato respiratório, funciona como um desencadeador e amplificador dos outros três mecanismos citados.⁽¹¹⁻¹⁴⁾

Radicais livres e espécies reativas

Radical livres são átomos, grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não-pareados em sua camada orbital externa, o que explica sua instabilidade e elevada reatividade.⁽¹⁵⁾ Entretanto, radical livre não é a designação ideal para o conjunto dos agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentem elétrons desemparelhados em sua última camada, embora participem das reações de oxirredução. Assim, os termos *reactive oxygen species* (ROS, espécies reativas de oxigênio) e *reactive nitrogen species* (RNS, espécies reativas de nitrogênio) são considerados mais apropriados por descreverem melhor esses agentes químicos.

As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos e têm origem no metabolismo do oxigênio molecular (O_2). Em condições fisiológicas, o O_2 sofre redução com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água.⁽¹⁶⁾ Durante esse processo, são formados intermediários reativos, tais como, os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^- ; Figura 1). As RNS, em sua maioria, são formadas a partir da síntese do óxido nítrico (NO) através da conversão da L-arginina a L-citrulina pelas sintases do óxido nítrico.⁽¹⁷⁾

A produção de espécies reativas é parte integrante do metabolismo e está presente em condições normais, notadamente nos processos fisiológicos envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias importantes, tais como hormônios e enzimas.⁽¹⁸⁾ Para contrabalançar essa produção e seus potenciais efeitos negativos, o organismo dispõe de um sistema antioxidante. Nas situações em que surge um desequilíbrio entre os sistemas pró- e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, ocorre o estresse oxidativo.⁽¹⁸⁾

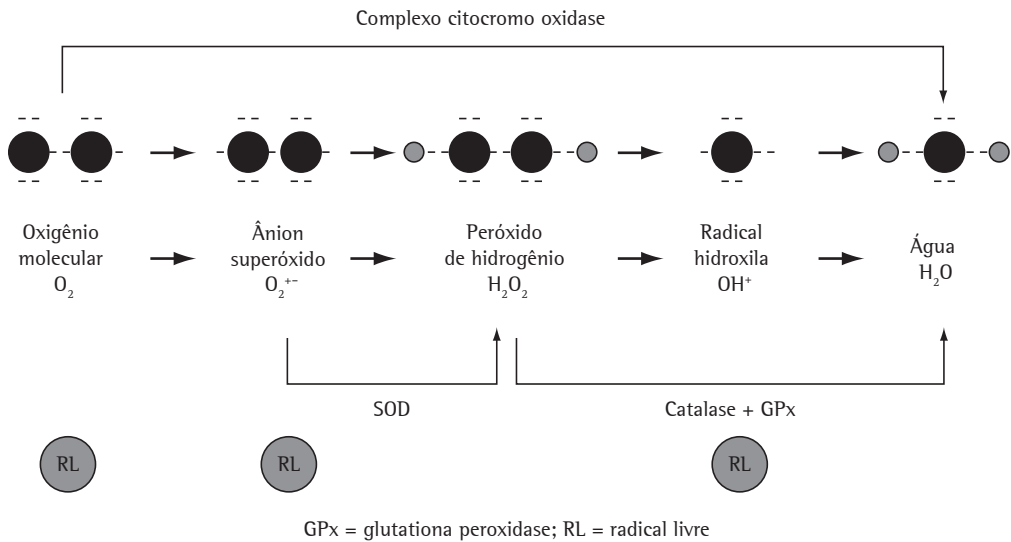


Figura 1 – A redução completa do oxigênio molecular (O_2), incorporando quatro elétrons ao final da cadeia respiratória, resulta na formação de água (H_2O) (seta superior). Cerca de 2-3% do O_2 sofre redução incompleta, gerando compostos intermediários. A enzima superóxido dismutase (SOD) converte o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, sob ação das enzimas catalase ou glutatona peroxidase (GPx), é convertido a H_2O .

Fontes endógenas e exógenas das espécies reativas

O trato respiratório é um alvo importante de danos causados por oxidantes, tanto de origem endógena quanto exógena, pelo fato de estar em contato direto com o meio externo e exposto a elevadas concentrações de oxigênio.^(18,19)

As espécies reativas de origem endógena são, geralmente, produzidas através de reações enzimáticas e não-enzimáticas de transferência de elétrons. Os principais sítios e processos celulares geradores de oxidantes são a mitocôndria, os microsossomos e os sistemas enzimáticos xantina/xantina oxidase e, em maior escala, NADPH oxidase.^(19,20) No trato respiratório, as principais fontes endógenas de oxidantes são os macrófagos alveolares, as células epiteliais, as células endoteliais e as células inflamatórias recrutadas, tais como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos.⁽¹⁸⁾ A ativação dessas células resulta na formação de $O_2^{\bullet-}$, que é rapidamente convertido a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD). Através de uma reação secundária não-enzimática, H_2O_2 , na presença de ferro, forma OH^{\bullet} (reação de Fenton).⁽¹⁹⁾ As espécies reativas produzidas pelos fagócitos são a principal causa de dano tissular associado a doenças pulmonares inflamatórias crônicas.⁽¹⁸⁾ Já os oxidantes

exógenos são originários de poluentes atmosféricos, tais como ozônio, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre e, em especial, a fumaça do cigarro. Essa última contém cerca de cinco mil compostos tóxicos, incluindo oxidantes potentes (aproximadamente 1.0^{14} radicais livres por cada inalação), tais como, acroleína, H_2O_2 , OH^{\bullet} e radicais orgânicos.⁽¹⁸⁾

Antioxidantes

Conforme sua estrutura, os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. Os principais componentes do sistema antioxidante enzimático são a SOD, a catalase e a glutatona peroxidase (GPx), que agem no início da cadeia de formação das espécies reativas, evitando o acúmulo dos radicais $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Os antioxidantes não-enzimáticos incluem compostos produzidos in vivo, tais como a glutatona reduzida (GSH), a ubiquinona, o ácido úrico e as proteínas de transporte de metais de transição (transferrina e ceruloplasmina), e compostos obtidos diretamente da dieta, tais como o betacaroteno e as vitaminas C e E.^(21,22)

Os principais antioxidantes do fluido do trato respiratório incluem a mucina, a GSH, o ácido úrico, proteínas (especialmente albumina) e o

ácido ascórbico.⁽²²⁾ Em fumantes e portadores de DPOC, ainda são escassas as informações sobre o sistema de defesa antioxidante no epitélio respiratório. Fumantes crônicos apresentam níveis elevados de GSH no lavado broncoalveolar. Entretanto, esse aumento de GSH pode não ser suficiente para neutralizar a excessiva carga de oxidantes durante a fase aguda do tabagismo, já que uma redução dos seus níveis é observada durante a exposição à fumaça do cigarro, de uma forma tempo e dose dependente.⁽¹⁴⁾

A melatonina, principal produto da glândula pineal, também possui atividade antioxidante significativa e destaca-se por algumas de suas características.⁽²³⁾ Sabe-se que a melatonina remove espécies reativas, incluindo singleto de O_2 , $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} e hidroperóxido lipídico⁽²³⁾ e, em alguns casos, sua eficiência tem-se mostrado superior à da GSH e à da vitamina E.⁽²⁴⁾ A ação antioxidante da melatonina parece ser especialmente relevante em função de sua capacidade de atravessar todas as barreiras morfofisiológicas e de distribuir-se amplamente nos tecidos, células e compartimentos subcelulares. A distribuição subcelular da melatonina possibilita sua interação com moléculas tóxicas na totalidade da célula, reduzindo o dano oxidativo tanto em meio lipídico quanto aquoso.⁽²³⁾ A melatonina também atua como antioxidante indireto, através do aumento da atividade das principais enzimas antioxidantes, incluindo SOD, catalase e GPx.⁽²³⁾ Diferentemente de outros antioxidantes,

a melatonina não participa do ciclo redox, que possibilita a uma molécula sofrer repetidamente oxidação e redução. O ciclo redox permite que um antioxidante, tal como a vitamina C, passe a atuar como pró-oxidante e promova a formação de radicais livres. A melatonina, uma vez oxidada, não pode ser reduzida ao seu estado anterior porque forma produtos finais estáveis. Devido a essa característica, a melatonina é, algumas vezes, referida como um antioxidante terminal ou suicida.

Estresse oxidativo e mecanismos etiopatogênicos da DPOC

A fumaça do cigarro é o principal fator ambiental para o desenvolvimento da DPOC. Entretanto, a taxa de declínio da função pulmonar em fumantes é variável⁽²⁵⁾ e somente cerca de 25% irão desenvolver uma expressão clínica da doença,⁽²⁶⁾ sugerindo que a gênese da DPOC depende da interação entre fatores ambientais e genéticos.

O enfisema por deficiência de alfa-1-antitripsina é a única forma de expressão da DPOC associada a alterações em um único gene e que não requer interação com fatores ambientais. Todos os outros casos da doença parecem resultar de alterações moleculares decorrentes de uma complexa interação de múltiplos genes e fatores ambientais. Dentre os genes associados às alterações observadas na DPOC, estão incluídos

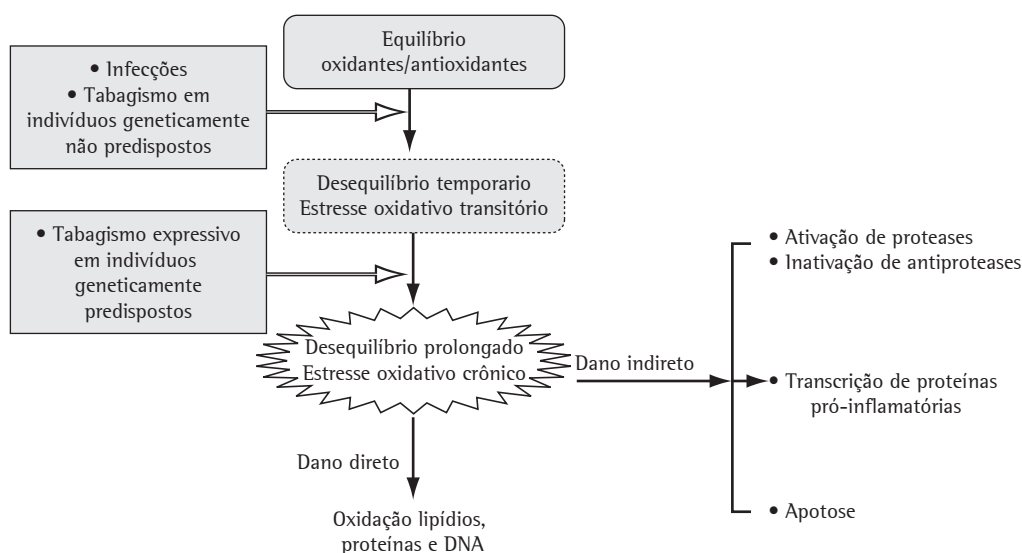


Figura 2 - O estresse oxidativo na DPOC gera danos diretos aos componentes pulmonares e participa como desencadeador e amplificador dos outros mecanismos etiopatogênicos.

aqueles relacionados ao sistema protease-anti-protease, antioxidantes, inflamação e apoptose.

O estresse oxidativo exerce um importante papel na gênese da DPOC através de danos diretos aos componentes do trato respiratório, bem como amplificando os outros mecanismos coparticipantes (Figura 2).

Estresse oxidativo e peroxidação lipídica

Basicamente, a peroxidação lipídica consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado, resultando em sua degradação oxidativa. Os fosfolipídios da membrana celular são particularmente suscetíveis ao processo de peroxidação. Isso acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, resultando em perda da seletividade da troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, tais como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, dentre eles, o malondialdeído (MDA).⁽²⁷⁾

Nos sistemas biológicos, os fosfolipídios da membrana celular podem ser hidrolisados pela enzima fosfolipase, produzindo o ácido araquidônico não-esterificado, que pode sofrer peroxidação por duas vias: a via enzimática, envolvendo as ciclo-oxigenases e as lipoxigenases, e a via não-enzimática, através da participação de ROS, RNS, metais de transição e outros radicais livres (Figura 3).⁽²⁷⁾ Os produtos finais da peroxidação lipídica mediada por espécies reativas incluem o 4-hidroxinonenal (4-HNE), o MDA e os isoprostanos. Dentre os isoprostanos, o 8-isoprostano tem sido o mais extensamente

estudado como marcador do estresse oxidativo pulmonar e sistêmico.⁽²⁸⁾

Além de sua importância como marcadores do estresse oxidativo, os isoprostanos, em especial o 8-isoprostano, possuem vários efeitos biológicos e são apontados como mediadores no dano oxidativo.⁽²⁸⁾ Dentre as várias atividades biológicas do 8-isoprostano, inclui-se a contração da musculatura lisa brônquica, sendo, por este motivo, apontado como um dos mediadores do componente reversível da obstrução observada em grande parte dos pacientes com DPOC.⁽²⁹⁾

Modificação de proteínas e DNA

Nas células eucarióticas, é raro que uma proteína exerça suas funções na forma original em que foi traduzida a partir de um gene. Ao sair dos ribossomos, as proteínas frequentemente sofrem modificações, denominadas modificações pós-tradução, consideradas essenciais para a sua atividade. Além dessas modificações fisiológicas, as proteínas estão sujeitas a uma variedade de modificações produzidas por espécies reativas, em condições patológicas. Essas modificações oxidativas podem inativar as funções enzimáticas e causar degeneração estrutural das proteínas ou ativar fatores de transcrição e sistemas proteolíticos.

Marcadores do estresse oxidativo e do dano ao DNA estão significativamente elevados em portadores de DPOC, especialmente naqueles cujo fator causal é o tabagismo.⁽³⁰⁾ Os portadores de DPOC apresentam uma incidência elevada de

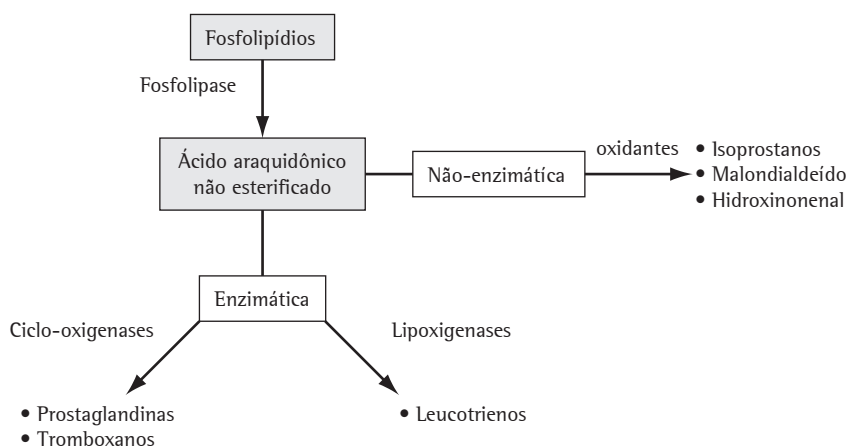


Figura 3 – O ácido araquidônico pode ser metabolizado por via enzimática, através das ciclo-oxigenases e das lipoxigenases, ou por via não-enzimática, através de processos de oxirredução.

neoplasia do pulmão, e as modificações do DNA pelas espécies reativas podem ser o elo entre essas duas condições.

Estresse oxidativo e inflamação

Fumantes sem DPOC apresentam uma resposta inflamatória discreta que representa, provavelmente, uma reação de defesa da mucosa à inalação crônica de irritantes. Nos indivíduos que desenvolvem DPOC, ocorre uma marcada amplificação da resposta inflamatória, que se acentua com a progressão da doença.^(31,32) O mecanismo molecular dessa amplificação ainda é desconhecido; porém, fatores genéticos, infecções virais latentes e o estresse oxidativo prolongado têm sido apontados como potenciais responsáveis.^(10,33) A inflamação crônica na DPOC está associada ao aumento da produção de vários mediadores e proteínas pró-inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas, enzimas inflamatórias, receptores e moléculas de adesão, que são reguladas por fatores de transcrição genética.^(10,33) Dentre os mediadores, destacam-se aqueles que exercem atividade quimiotática para células inflamatórias, notadamente o leucotrieno B₄ e IL-8, assim como as citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6.⁽³³⁾ Também são considerados importantes os fatores de crescimento, incluindo TGF- β , que induz fibrose nas pequenas vias aéreas.⁽³³⁾ Os elementos celulares mais importantes na inflamação na DPOC são as células epiteliais, os neutrófilos, os macrófagos alveolares e os linfócitos CD8, assim como, durante os períodos de exacerbação, os eosinófilos.^(10,33)

A resposta da célula a estímulos depende de um complexo processo de sinalização. Os estímulos do meio extracelular são transmitidos ao meio intracelular através de uma sequência ordenada de reações, parte delas dependente de reações de oxirredução, geralmente referidas como sinalização redox-sensível.^(19,34) Em condições fisiológicas, o controle dessa sinalização redox-sensível envolve um desvio temporário do estado redox em direção a um aumento da concentração de oxidantes. Esses pequenos episódios oxidativos geram baixas concentrações celulares de ROS quando sob estímulo de substâncias, tais como citocinas (IL-1, IL-6, IL-3, TNF- α), angiotensina II e fatores de crescimento.⁽¹⁹⁾ Os sinais para os elementos responsáveis pela expressão de alguns genes são normalmente transmitidos ao núcleo por

uma classe de proteínas chamadas de fatores de transcrição. Esse processo de transdução de sinalização resulta em funções biológicas, tais como contração muscular, expressão gênica, crescimento celular e transmissão nervosa. Portanto, a iniciação e o funcionamento correto de várias vias de transdução dependem de ROS como moléculas sinalizadoras, que atuam como um segundo mensageiro.⁽¹⁹⁾ Sob condições patológicas, entretanto, concentrações anormalmente elevadas de ROS nas células podem levar a mudanças permanentes na transdução da sinalização e na expressão genética, como observado nas doenças inflamatórias crônicas, incluindo a DPOC.

A expressão dos genes pode ser influenciada pelas enzimas histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetilases (HDACs). A acetilação dos resíduos de lisina na terminação N dessas proteínas, catalisadas pelas HATs, remove cargas positivas e, desse modo, reduz a sua afinidade pelo DNA, tornando a cromatina menos compacta e mais acessível aos fatores de transcrição e à RNA polimerase. Inversamente, a desacetilação, catalisada pelas HDACs, torna a cromatina mais compacta e menos acessível (Figura 4). Consequentemente, na maioria dos casos, as HATs intensificam a transcrição, enquanto as HDACs reprimem a transcrição. O estresse oxidativo intracelular promove a ativação dos genes codificadores de várias proteínas pró-inflamatórias através de dois mecanismos: em primeiro lugar, ativando a enzima quinase kappa B, que degrada o complexo proteico inibidor kappa B, promovendo a liberação do fator nuclear kappa B; e, em segundo lugar, inativando a enzima histona desacetilase 2 (HDAC2), permitindo um maior grau de acetilação da proteína pela enzima HAT, resultando em descompactação da cromatina e maior acesso dos fatores de transcrição aos genes.^(19,31,35)

A supressão dos genes pró-inflamatórios pelos glicocorticoides deve-se, em parte, ao recrutamento da enzima HDAC2, que promove a compactação da cromatina, impedindo assim a transcrição de proteínas pró-inflamatórias. Como mencionado anteriormente, a inflamação na DPOC é relativamente insensível ao tratamento com corticosteroides. Um dos mecanismos propostos para explicar essa relativa resistência é a redução dos níveis da enzima HDAC2 por degradação oxidativa induzida

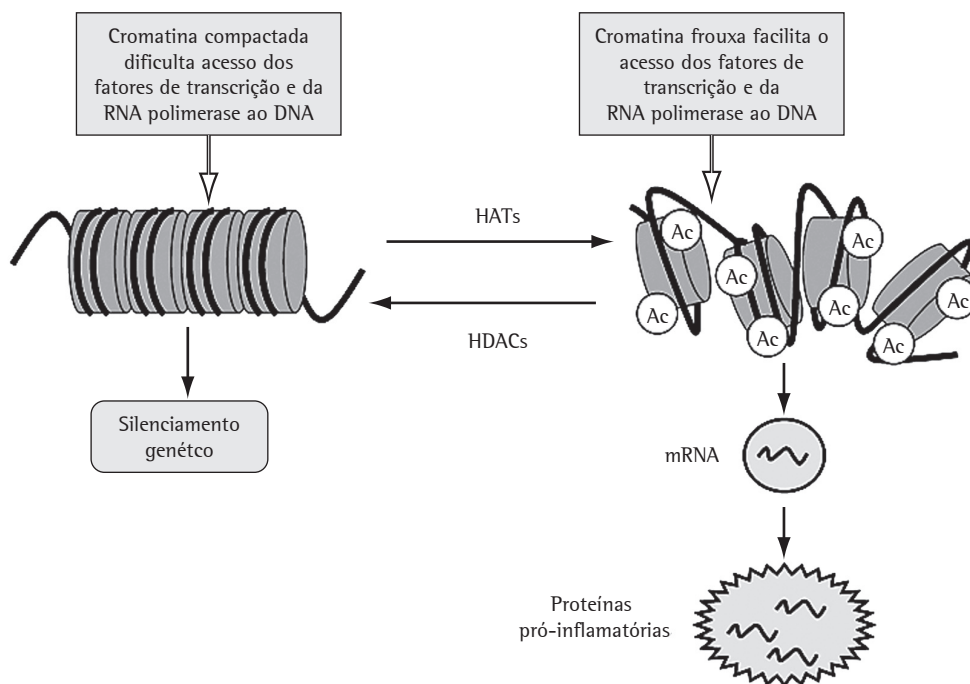


Figura 4 - Em doenças inflamatórias crônicas, incluindo a DPOC, a acetilação da histona pelas histona acetiltransferases (HATs) torna a cromatina frouxa, facilitando, desse modo, o acesso dos fatores de transcrição e da RNA polimerase ao DNA, acarretando um aumento da produção de proteínas pró-inflamatórias (interleucinas, quimiocinas e moléculas de adesão). Inversamente, a desacetilação da histona pelas histona desacetilases (HDACs) torna a cromatina compactada, dificultando o acesso dos fatores de transcrição e da RNA polimerase ao DNA, o que resulta em uma redução da produção de proteínas pró-inflamatórias. Modificado.⁽³¹⁾

por espécies reativas, tais como, peroxinitrito (ONOO⁻), acroleína e 4-HNE.^(9,35) Os macrófagos alveolares de portadores de DPOC apresentam concentrações reduzidas de HDAC2 quando comparados com macrófagos de indivíduos com função pulmonar normal, e essa redução está correlacionada com a insensibilidade aos corticoides. A restauração da expressão da HDAC2 reverte essa resistência.⁽³⁶⁾

Estresse oxidativo e desequilíbrio do sistema protease-antiprotease

Existem fortes evidências de que um desequilíbrio entre as proteases e as antiproteases endógenas exerce um papel importante na gênese da DPOC. Dentre os fatores que contribuem para esse desequilíbrio estão o estresse oxidativo, o polimorfismo genético e a resposta inflamatória anômala à agressão do trato respiratório por tabagismo.^(33,37,38)

Três classes de proteases são consideradas relevantes na etiopatogenia da DPOC: as proteases de serina, capazes de degradar a elastina

e algumas formas de colágeno; as proteases de cisteína, que degradam componentes de matriz; e as metaloproteases da matriz, que têm ação sobre o colágeno, a gelatina e a laminina. Cada uma dessas classes de enzimas pode ser inibida por uma ou mais antiproteases.

Os oxidantes podem potencializar os efeitos das proteases na DPOC através da ativação dessas enzimas. Espécies reativas aumentam a atividade das metaloproteases de matriz por ativação das precursoras pró-metaloproteases. A oxidação de resíduos de metionina em sítios ativos da alfa-1-antitripsina resulta em uma redução dramática da sua capacidade inibitória *in vitro*, e, portanto, essa via tem sido apontada como uma das possíveis causas do desequilíbrio em favor das proteases.^(11,33,37,38)

Estresse oxidativo e apoptose

Trabalhos recentes destacam a importância da apoptose na gênese da DPOC.^(38,39) Acredita-se que um incremento na apoptose das células epiteliais e endoteliais dos pulmões, não contra-

balançado pelo aumento da proliferação dessas células, resulta em destruição dos tecidos e em desenvolvimento de enfisema.

Existem evidências de que o VEGF é necessário para a manutenção da estrutura celular dos pulmões.⁽⁴⁰⁾ O VEGF representa, na verdade, uma subfamília de fatores de crescimento derivados das plaquetas que se ligam a três conjuntos de receptores: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. A ligação do VEGF aos receptores VEGFR-2 estimula as células endoteliais e os pneumócitos tipo II, promovendo seu desenvolvimento e aumentando sua sobrevivência. A interrupção da sinalização do VEGF para os receptores VEGFR-2 resulta em uma parada do desenvolvimento pulmonar, que se manifesta clinicamente, na infância, por displasia broncopulmonar e, no adulto, por enfisema.⁽⁴¹⁾

O enfisema humano pode estar associado a uma expressão reduzida do gene codificador do VEGF. Em um modelo de enfisema induzido por bloqueio de VEGF em ratos, foi demonstrado que a apoptose predomina em áreas do pulmão sob estresse oxidativo e que o bloqueio experimental da apoptose reduz de maneira acentuada a expressão de marcadores do estresse oxidativo. A administração de compostos com atividade antioxidante é capaz de prevenir o desenvolvimento de apoptose de células alveolares, sugerindo uma interação por retroalimentação positiva entre estresse oxidativo e apoptose.⁽⁴¹⁾ Recentemente, observou-se que o estresse oxidativo está associado a uma redução dos níveis de VEGF no escarro de portadores de DPOC. Foi sugerido que o estresse oxidativo possa induzir dano às células epiteliais, reduzindo dessa forma os níveis de VEGF e, conseqüentemente, favorecendo o desenvolvimento de enfisema.⁽³²⁾ Outro mecanismo apontado como indutor da apoptose pelo estresse oxidativo é a ativação de algumas enzimas mitocondriais, incluindo caspase-3.⁽³⁹⁾

Avaliação do estresse oxidativo na DPOC

O estresse oxidativo pode ser medido pela quantificação direta da produção de oxidantes ou, indiretamente, pela quantificação de produtos decorrentes da peroxidação lipídica, tais como 8-isoprostano, 4-HNE e MDA, no espaço alveolar, no ar exalado, no escarro e no sangue.⁽³⁷⁾

A coleta do condensado do ar exalado (CAE) é um método não-invasivo para a obtenção de amostras de material do trato respiratório

inferior.⁽⁴²⁾ Esse método tem sido usado para a determinação da concentração de diversos marcadores do estresse oxidativo em pacientes com DPOC, dentre eles, H_2O_2 , derivados do NO (nitrito, nitrato e S-nitrosotióis) e 8-iso-prostaglandina $F2\alpha$ (8-isoprostano).^(11,42,43)

Vários estudos mostram uma elevação de marcadores do estresse oxidativo nos pulmões dos pacientes com DPOC quando comparados a indivíduos normais e a indivíduos com a mesma carga tabágica sem DPOC.^(30,32) Fumantes e pacientes com DPOC apresentam níveis mais elevados de H_2O_2 no CAE, uma medida direta da carga oxidativa do espaço aéreo, do que ex-fumantes com DPOC e não-fumantes.⁽³⁷⁾ Pacientes com DPOC relacionada à inalação de fumaça proveniente da queima de biomassa apresentam níveis de MDA semelhantes àqueles observados em portadores de DPOC associada ao tabagismo e significativamente mais elevados que aqueles em controles normais.⁽⁴⁴⁾ Durante as exacerbações agudas da DPOC, as concentrações de H_2O_2 são maiores que durante os períodos de estabilidade da doença.^(37,45) Acredita-se que as concentrações elevadas de H_2O_2 no CAE são originadas, em parte, por uma maior produção de ânions superóxido pelo macrófago alveolar.⁽³⁷⁾ Os macrófagos alveolares dos indivíduos fumantes apresentam um maior conteúdo de ferro, quando comparados aos dos não-fumantes, resultando em um aumento do ferro livre no espaço aéreo, o que poderia estimular a geração de ROS através da reação de Fenton.⁽¹⁵⁾ Uma fonte adicional de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 é a reação da xantina/xantina oxidase, que apresenta atividade aumentada nas células do lavado broncoalveolar e no plasma de fumantes e de portadores de DPOC, quando comparados a indivíduos saudáveis não-fumantes.⁽¹⁵⁾

A concentração de NO na fase gasosa do ar exalado tem sido utilizada como um marcador direto de inflamação e, de modo indireto, do estresse oxidativo. Os portadores de DPOC apresentam níveis de NO inferiores aos portadores de asma.⁽⁴⁶⁾ A reação rápida do NO com $O_2^{\cdot-}$ formando ONOO⁻ ou com tióis formando nitrosotióis pode alterar os níveis de NO no ar exalado e explicar, pelo menos em parte, a diferença nas concentrações entre os portadores de asma e os de DPOC. Os níveis de NO no ar exalado são elevados em fumantes, portadores ou não de DPOC, o que limita a validade desse marcador no diagnóstico de DPOC.

Os produtos da peroxidação lipídica, tais como as substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico, estão elevados no escarro dos pacientes com DPOC e apresentam correlação negativa com VEF_1 .⁽¹¹⁾ Através de uma reação não-enzimática, o ácido araquidônico, sofrendo peroxidação mediada por ROS, produz isoprostanos (Figura 3). Portadores de DPOC apresentam níveis elevados de 8-isoprostano no CAE quando comparados a controles normais ou a fumantes sem DPOC.⁽⁴⁷⁾ Os níveis de 8-isoprostano apresentam correlação positiva com o percentual de neutrófilos no escarro induzido, o que constitui uma evidência adicional de que o estresse oxidativo exerce modulação positiva na inflamação na DPOC.⁽⁴³⁾

Marcadores sistêmicos do estresse oxidativo e níveis plasmáticos elevados de mediadores inflamatórios têm sido relatados em fumantes e em portadores de DPOC.^(48,49) Os neutrófilos periféricos de portadores de DPOC liberam mais ROS que os de indivíduos normais não-fumantes.⁽⁵⁰⁾ Produtos da peroxidação lipídica também estão aumentados no plasma de fumantes com DPOC, particularmente durante os períodos de exacerbação.⁽⁷⁾ O estresse oxidativo e a inflamação crônica estão incluídos entre os fatores envolvidos no mecanismo gerador das manifestações sistêmicas, tais como a perda de peso e a disfunção da musculatura esquelética, observadas em alguns pacientes com DPOC. Os portadores de DPOC também apresentam um risco aumentado para doença cardiovascular.⁽⁷⁾ Um dos mecanismos prováveis para esse aumento é o dano endotelial causado pela inflamação e pelo estresse oxidativo sistêmicos presentes nestes pacientes.⁽⁷⁾

Novos métodos diagnósticos e terapêuticos

Os principais agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento de manutenção da DPOC são os broncodilatadores de ação prolongada, incluindo os β_2 -agonistas (formoterol e salmeterol) e os anticolinérgicos (tiotrópio), que não modificam de forma expressiva a progressão e a mortalidade da doença.

Alguns fatores explicam a dificuldade no desenvolvimento de drogas mais eficazes para o tratamento da DPOC. Em primeiro lugar, os modelos animais de DPOC para testes de fármacos não são considerados adequados. Atualmente, utilizam-se modelos de enfisema e não de doença das pequenas vias aéreas, como seria desejável para avaliar potenciais medicamentos capazes de interferir precocemente

na progressão da doença. Em segundo lugar, estudos dos efeitos das drogas sobre desfechos centrados no paciente, tais como o declínio da perda de função e de mortalidade, são caros e de execução prolongada. Ademais, vários portadores de DPOC apresentam comorbidades, tais como diabetes melito e doença coronariana, frequentemente presentes nos critérios de exclusão de ensaios clínicos de novas drogas. Por fim, marcadores adotivos, tais como biomarcadores no sangue, escarro e ar exalado, que monitoram a eficácia a curto prazo, ainda estão em fase de validação.⁽⁴²⁾

Mais recentemente, têm surgido relatos promissores de novas técnicas e métodos diagnósticos, bem como da identificação de potenciais alvos terapêuticos que permitam modificar, de fato, o curso clínico e o prognóstico da doença. Entre os novos métodos diagnósticos merece destaque a coleta do ar exalado. Trata-se de um método simples e não-invasivo, que permite a obtenção de material proveniente dos tecidos pulmonares para a detecção de marcadores da inflamação e do estresse oxidativo.⁽⁴²⁾ É provável que, num futuro próximo, a determinação do nível de estresse oxidativo no pulmão passe a ser usada rotineiramente como um indicador das alterações patológicas que precedem a expressão clínico-funcional da DPOC.

As drogas com ação direta ou indireta sobre os mecanismos patogênicos da DPOC, incluindo os antagonistas de mediadores pró-inflamatórios, as drogas inibidoras das antiproteases e os agentes modificadores da resposta inflamatória, bem como as drogas capazes de alterar a resistência da inflamação da DPOC aos esteroides, são alternativas com o potencial de modificar a evolução e o prognóstico da doença.^(51,52) Os agentes terapêuticos deste último grupo – modificadores da ação dos corticoides sobre a inflamação na DPOC – são considerados os mais promissores. Como já foi mencionado, acredita-se que a resistência da inflamação aos corticoides na DPOC deva-se à redução da expressão e atividade da HDAC2 pelo estresse oxidativo.^(31,53,54) Sabe-se que drogas, como as xantinas e alguns macrolídeos, podem aumentar a expressão da HDAC2.^(36,55)

O estresse oxidativo, além de reduzir a expressão e a atividade da HDAC2, é apontado como um importante amplificador de outros mecanismos patogênicos da DPOC.^(11,33) Portanto, o emprego de agentes antioxidantes pode, potencialmente, reduzir o dano direto do estresse oxidativo aos tecidos pulmonares e a

sua ação amplificadora sobre os outros mecanismos envolvidos na DPOC, além de reverter a resistência da inflamação aos esteroides. Até o presente, poucos agentes antioxidantes foram testados no tratamento de portadores de DPOC. A N-acetilcisteína, um precursor da glutatona, mostrou-se capaz de reduzir a concentração de H_2O_2 no condensado do ar exalado de pacientes com DPOC^(56,57); porém, não preveniu a deterioração da função pulmonar, nem reduziu a frequência de exacerbações.⁽⁵⁸⁾ A N-acetilcisteína é um antioxidante relativamente fraco, suscetível de inativação pelo estresse oxidativo. É provável que substâncias com ação antioxidante mais potente e com maior estabilidade, ou seja, não participantes do ciclo redox, possam conduzir a um declínio significativo do estresse oxidativo, modificando assim a progressão da doença.

Considerações finais

O estresse oxidativo exerce um importante papel na gênese da DPOC através de danos diretos aos componentes do trato respiratório, bem como amplificando outros mecanismos coparticipantes. Uma melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos na patogênese da DPOC possibilitará o surgimento de novas abordagens que permitam a detecção da doença em seus estágios iniciais, o monitoramento adequado de sua atividade e a introdução de novos agentes terapêuticos capazes de impedir sua progressão.

Referências

- Pinto RA, Holanda MA, Medeiros MM, Mota RM, Pereira ED. Assessment of the burden of caregiving for patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2007;101(11):2402-8.
- Nunes DM, Mota RM, de Pontes Neto OL, Pereira ED, de Bruin VM, de Bruin PF. Impaired sleep reduces quality of life in chronic obstructive pulmonary disease. *Lung.* 2009;187(3):159-63.
- World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization; c2009 [cited 2009 Jul 2]. World Health Report 2008. Available from: <http://www.who.int/whr/2008/en/index.html>
- Menezes AM, Jardim JR, Pérez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2005;21(5):1565-73.
- Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica DPOC. *J Pneumol.* 2004;30(Suppl 5):S1 S42.
- Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2000;343(4):269-80.
- Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J.* 2009;33(5):1165-85.
- Barnes PJ. Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest.* 2000;117(2 Suppl):105-45.
- Barnes PJ, Ito K, Adcock IM. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. *Lancet.* 2004;363(9410):731-3.
- MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):258-66 ; discussion 290-1.
- MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(1):50-60.
- MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med.* 2007;28(3):479-513, v.
- Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, et al. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(1-2):60-8.
- MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol Med.* 2001;7(2):55-62.
- Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 2006;111(2):476-94.
- Andrade Jr DR, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Oxygen free radicals and pulmonary disease. *J Bras Pneumol.* 2005;31(1):60-8
- Mak JC. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12(4):368-74.
- Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(4):799-811.
- Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology.* 2009;14(1):27-38.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408(6809):239-47.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007;30(5):1323-38.
- MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest.* 2000;117(5 Suppl 1):303S-17S.
- Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidant enzymes. *J Pineal Res.* 2005;39(2):99-104.
- Sofic E, Rimpapa Z, Kundurovic Z, Sapcanin A, Tahirovic I, Rustembegovic A, et al. Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. *J Neural Transm.* 2005;112(3):349-58.
- Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J.* 1977;1(6077):1645-8.
- Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax.* 2006;61(11):935-9.
- Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm.* 2001;37(3):293-303.
- Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ 2nd. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 2004;18(15):1791-800.

29. Rolin S, Masereel B, Dogné JM. Prostanoids as pharmacological targets in COPD and asthma. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):89-100.
30. Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, Aksoy N, Selek S. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respir Med.* 2006;100(7):1270-6.
31. Barnes PJ. Role of HDAC2 in the Pathophysiology of COPD. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:451-64.
32. Kanazawa H, Yoshikawa J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest.* 2005;128(5):3191-7.
33. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003;22(4):672-88.
34. Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(4):799-811.
35. Rahman I, Marwick J, Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):1255-67.
36. Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes PJ. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med.* 2004;200(5):689-95.
37. Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):373-85; discussion 394-5.
38. Tuder RM, Yoshida T, Arap W, Pasqualini R, Petrache I. State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(6):503-10.
39. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res.* 2006;7:53.
40. McGrath-Morrow SA, Cho C, Cho C, Zhen L, Hicklin DJ, Tuder RM. Vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade disrupts postnatal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(5):420-7.
41. Tuder RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(1):88-97.
42. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005;26(3):523-48.
43. Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. *Chest.* 2003;124(4):1373-80.
44. Montano M, Cisneros J, Sansores R, Mercado D, Ramirez A, Ramos C. Oxidative Stress in COPD Associated to Biomass Exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:A2952.
45. Gerritsen WB, Asin J, Zanen P, van den Bosch JM, Haas FJ. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir Med.* 2005;99(1):84-90.
46. Delen FM, Sippel JM, Osborne ML, Law S, Thukkani N, Holden WE. Increased exhaled nitric oxide in chronic bronchitis: comparison with asthma and COPD. *Chest.* 2000;117(3):695-701.
47. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzari N, Corradi M, Kharitonov SA, et al. 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(3 Pt 1):1175-7.
48. Gan WQ, Man SF, Senthilvelan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax.* 2004;59(7):574-80.
49. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(4 Pt 1):1179-84.
50. Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(2):473-9.
51. Barnes PJ. Future treatments for chronic obstructive pulmonary disease and its comorbidities. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(8):857-64.
52. de Boer WJ, Yao H, Rahman I. Future therapeutic treatment of COPD: struggle between oxidants and cytokines. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2007;2(3):205-28.
53. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2005;352(19):1967-76.
54. Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, et al. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med.* 2006;203(1):7-13.
55. Adcock IM, Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest.* 2008;134(2):394-401.
56. Kasielski M, Nowak D. Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2001;95(6):448-56.
57. De Benedetto F, Aceto A, Dragani B, Spacone A, Formisano S, Pela R, et al. Long-term oral n-acetylcysteine reduces exhaled hydrogen peroxide in stable COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(1):41-7.
58. Decramer M, Rutten-van Mölken M, Dekhuijzen PN, Troosters T, van Herwaarden C, Pellegrino R, et al. Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2005;365(9470):1552-60.

Sobre os autores

Antonio George de Matos Cavalcante

Médico do Serviço de Pneumologia. Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE) Brasil.

Pedro Felipe Carvalho de Bruin

Professor Associado. Departamento de Medicina Clínica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE) Brasil.