

- ¹² C. Chothia e P. Pauling, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 65, 477 (1970).
- ¹³ C. Chothia, *Nature*, 225, 36 (1970).
- ¹⁴ C. Chothia, R. W. Baker e P. Pauling, *J. Mol. Biol.* 105, 517 (1976).
- ¹⁵ D. Cioli e P. M. Knopf, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 220 (1980).
- ¹⁶ M. J. Dotson, S. H. Chu e G. R. Hillman, *Comp. Biochem. Physiol.*, 68C, 229 (1981).
- ¹⁷ G. R. Hillman, A. W. Senft e W. B. G. Gibler, *J. Parasitol.*, 64, 754 (1978).
- ¹⁸ G. R. Hillman, W. B. Gibler e S. H. Chu, *Biochem. Pharmacol.*, 25, 2529 (1976).
- ¹⁹ A. W. Senft, D. G. Senft, G. R. Hillman, D. Polk e S. Kryger, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25, 832 (1976).
- ²⁰ C. H. Wei e J. R. Einstein, *Acta Cryst.*, B34, 2986 (1978).

NOVIDADE CIENTÍFICA

ESTUDOS DA ATIVAÇÃO DE OXIGÊNIO EM RESIDENTES DE VILA PARISI

Etelvino J. H. Bechara e Marisa H. G. Medeiros

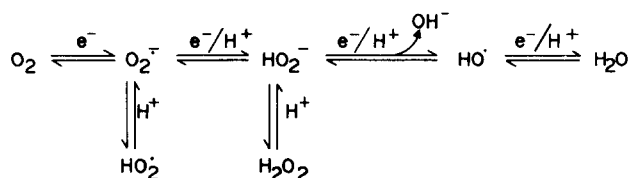
Depto. de Bioquímica do Instituto de Química da USP, São Paulo, SP.

Recebido em 02/05/83

1. INTRODUÇÃO

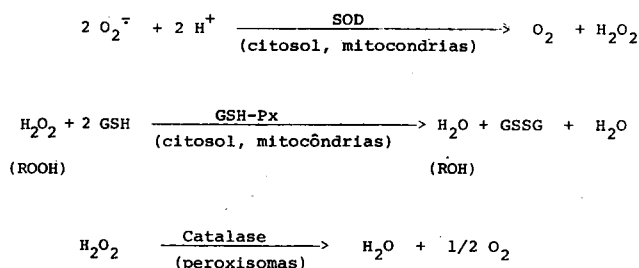
Existe hoje vasta e crescente documentação bibliográfica que comprova a associação entre as manifestações clínicas de várias desordens genéticas e adquiridas e distúrbios metabólicos no modo de utilização de oxigênio pelas células¹⁻⁵. É fato reconhecido que o acúmulo ou a baixa produção de espécies ativadas de oxigênio molecular dentro das organelas celulares, como o par superóxido/radical perhidroxila ($O_2^-/HO_2^\cdot$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($HO^\cdot$), resultantes da redução parcial de O_2 em sucessivas etapas de um elétron (Esquema 1) — pode ser nocivo aos organismos vivos.

Esquema 1:



As principais fontes bioquímicas de espécies ativadas de oxigênio têm sido identificadas como as ferroproteínas (hemoglobina e cit P_{450} , por ex.), as flavoenzimas (xantina oxidase, D-aminoácido oxidase, NADPH cit P_{450} redutase, etc.) e difenóis (coenzima Q, por ex.). Superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase, por outro lado, são as enzimas-chave, responsáveis pelo controle da concentração intracelular daquelas espécies ativadas, "tóxicas", de oxigênio (Esquema 2). Estariam, assim, envolvidas na proteção biológica contra a "toxicidade de oxigênio". Significativamente, a velocidade de biossíntese de SOD aumenta sob oxigênio hiperbárico⁶ e GSH-Px também tem sua síntese induzida por peróxidos⁷⁻⁸. Nos últimos sete anos, a ativação do oxigênio tem sido evocada para explicar manifestações neuropsiquiátricas^{1,9} (autismo, mon-

Esquema 2:



golismo, esquisofrenia, doença de Parkinson, porfiria aguda intermitente, etc.), a destruição de microorganismos invasores por fagócitos¹⁰, processos inflamatórios e crescimento de tumores malignos^{11,12}, desordens hepáticas¹³, anemias hereditárias (β -talassemia, por ex.)¹⁴, danos durante radioterapia¹⁵, envelhecimento precoce¹⁶, etc.

Em 1977, Michelson e colaboradores¹⁷ relataram que moradores da cidade de Paris apresentam níveis eritrocitários de SOD cerca de 38% mais altos que aqueles da população rural da França. A determinação da catalase eritrocitária indicou um valor cerca de 22% mais alto na população rural. Nem as causas bioquímicas, nem o significado destes resultados, foram entretanto aventadas por estes autores. Decidimos, então, investigar os níveis das enzimas SOD, GSH-Px e catalase nas hemácias de residentes de Vila Parisi — um bairro de Cubatão (SP), conhecido como uma zona de altíssima concentração industrial, com controle deficiente da poluição ambiental — e compará-los com uma amostragem da cidade de São Paulo. Almejávamos com este estudo obter informações seguras, ao nível bioquímico, que pudessem lançar alguma luz sobre possíveis conexões entre poluição ambiental, hemoglobinemia (constatada em Cubatão por P.C. Naoum e colaboradores¹⁸), toxicidade de oxigênio e malformações congênitas, já que H_2O_2 , HO_2^- e radicais $HO^\cdot$ são reconhecidamente potentes agentes mutagênicos.

2. EXPERIMENTAL

Os níveis eritrocitários de SOD, GSH-Px e catalase foram pesquisados, nos meses de junho e julho de 1981, em dois grupos de indivíduos: o primeiro grupo consistiu de 23 voluntários aparentemente saudáveis (brancos e mulatos de ambos os sexos com 15 a 45 anos de idade), residentes em Vila Parisi há mais de um ano; o grupo controle eram 31 residentes da cidade de São Paulo (brancos e mulatos de ambos os sexos com 18 a 40 anos de idade), saudáveis, incluindo alunos de uma escola preparatória de soldados da Polícia Militar de São Paulo e estudantes, professores e funcionários do Instituto de Química da USP. Nenhum dos voluntários estava sob medicação e as amostras de sangue (4,5 ml) foram coletadas sobre citrato de sódio.

As atividades enzimáticas foram medidas em hemolisados segundo procedimentos descritos por Maral e colab.¹⁹, isto é: (i) SOD foi determinada espectrofotometricamente pela inibição da redução de "nitro blue tetrazolium" promovida por superóxido, gerado durante reoxidação de riboflavina fotoreduzida na presença de metionina, (ii) GSH-Px foi dosada espectrofotometricamente pela inibição da oxidação de NADPH (catalisada por glutatona redutase) por glutatona oxidada, produzida na ação de GSH-Px sobre o sistema GSH/terciobutil hidroperóxido e (iii) catalase foi dosada fotometricamente pela sua ação supressora da quimiluminescência produzida na oxidação de luminol por H_2O_2 . As misturas-padrão de reação, contendo hemolisado pré-fervido durante cerca de 2 horas, foram usadas como branco. Todas as atividades enzimáticas são expressas por grama de hemoglobina, a 25°C (SOD e catalase) ou 37°C (GSH-Px).

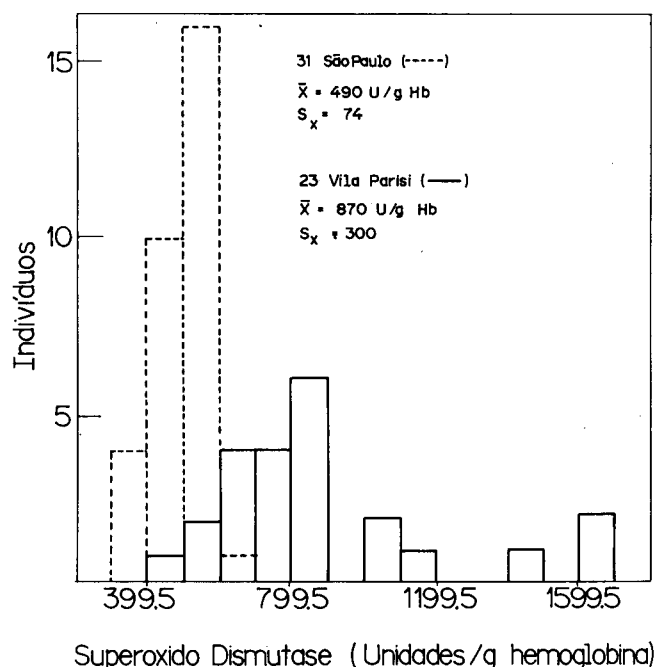


Fig. 1 Distribuição dos valores de superóxido dismutase por grama de hemoglobina em eritrócitos de residentes em Vila Parisi (—) e na cidade de São Paulo (-----).

3. RESULTADOS

Nas figuras 1 a 3, são apresentados os histogramas correspondentes às atividades eritrocitárias de SOD, GSH-Px e catalase, respectivamente, encontradas na amostragem de Vila Parisi ($n = 23$, 24 e 22, respectivamente) e no grupo-controle de residentes de São Paulo ($n = 31$, 21 e 31, respectivamente). Os níveis de hemoglobina nas amostragens de São Paulo ($n = 31$) estavam na faixa de 12 a 17 g/100 ml de sangue ($\bar{X} = 14,4$ g/100 ml; $S_x = 1,5$). Três dos voluntários de Vila Parisi apresentaram níveis de hemoglobina abaixo de 10 g/110 ml.

Devido ao pequeno tamanho das amostragens, usamos o tratamento estatístico não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov²⁰ para comparar os dois grupos de indivíduos: no caso de SOD ($D = 0,70$; $\alpha = 0,05$) e glutatona peroxidase ($D = 0,80$; $\alpha = 0,05$), os dois grupos pertencem claramente a diferentes populações, enquanto que no que diz respeito à catalase, os dois grupos são idênticos.

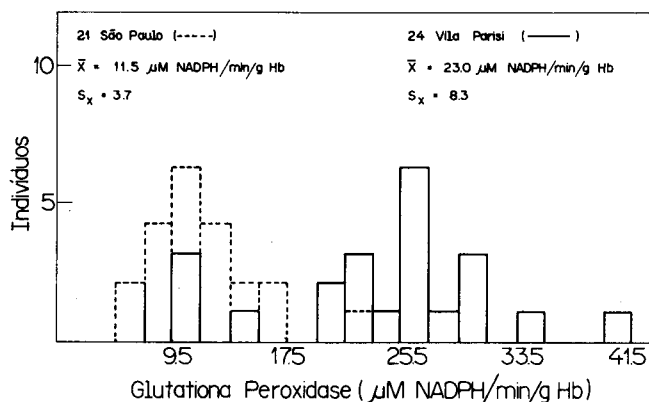


Fig. 2 Distribuição dos valores de glutatona peroxidase por grama de hemoglobina em eritrócitos de residentes em Vila Parisi (—) e na cidade de São Paulo (-----).

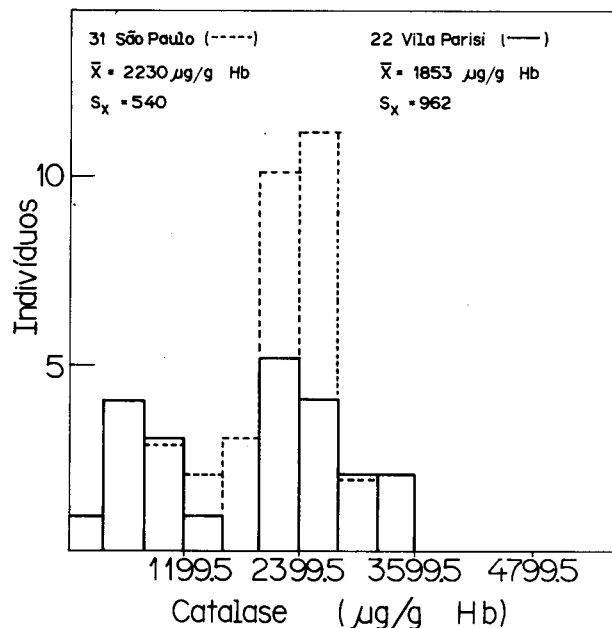


Fig. 3 Distribuição dos valores de catalase por grama de hemoglobina em eritrócitos de residentes em Vila Parisi (—) e na cidade de São Paulo (-----).

3

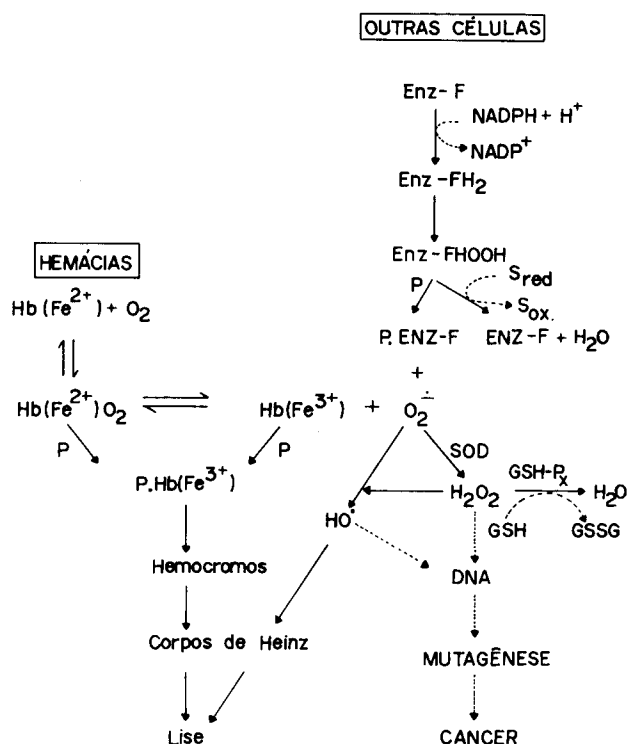
4. DISCUSSÃO

O processo de degradação oxidativa de hemoglobina a corpos de Heinz, um precipitado intracelular de globina, passa por vários estágios (oxiHB → metHB → hemocromos → corpos de Heinz → lise) e é desencadeado por vários agentes redutores, oxidantes, ou mesmo compostos que se associam fortemente à proteína^{21,22}. Estudos "in vitro" mostram claramente que, no estágio inicial, a oxidação de oxiemoglobina a metemoglobina ou sulfoemoglobina produz concomitantemente radicais superóxido (O_2^-/HO_2), os quais (i) por dismutação geram H_2O_2 e (ii) por reação com H_2O_2 formam radicais hidroxila (reação de Haber-Weiss). O esquema 3 resume estas interrelações.

Cubatão comporta compostos potencialmente ativos na degradação de hemoglobina.

As altas atividades eritrocitárias de SOD e GSH-Px encontradas em residentes de Cubatão (fator de 2, em média), comparadas à amostragem de São Paulo, indicam indução de síntese destas enzimas e confirmam os resultados de Naoum e colab.. De fato, é bastante razoável atribuir estes altos níveis de SOD e GSH-Px a uma resposta biológica de proteção contra o acúmulo de superóxido e H_2O_2 , produzidos na oxidação de oxiemoglobina a metemoglobina. Isto representaria um exemplo notável de adaptação, para prevenir processos deletérios causados pelas péssimas condições ambientais. Os valores "normais" de catalase encontrados em residentes de Vila Parisi não são inesperados, já que esta enzima parece atuar apenas em situações de emergência para controlar níveis excessivos de H_2O_2 ; o controle "fino" de concentrações intracelulares de H_2O_2 é realizado pelo sistema de GSH-Px²³. A larga distribuição dos valores individuais das atividades enzimáticas, por outro lado, pode ser atribuída a diferentes respostas individuais ao mesmo nível de poluição ambiental ou refletir diversidade na natureza e níveis de exposição a poluentes no local de trabalho ou nas residências.

Deve-se ainda ressaltar que a interação de vários poluentes conhecidos lançados à atmosfera, solo e águas de Cubatão com citocromo P₄₅₀ e outras ferroproteínas e com enzimas flavínicas, presentes em quase todas as organelas celulares (por ex.: succinato desidrogenase e ácido desidrogenase, em mitocôndrias; xantina oxidase, no citosol; NADPH cit P₄₅₀ redutase e L-aminoácido oxidase no retículo endoplasmático; D-aminoácido oxidase, urato oxidase e lactato oxidase, em peroxisomas, etc.) pode levar também à produção exacerbada de espécies ativadas de oxigênio (Esquema 3). Em conexão com este quadro de "toxicidade de oxigênio ativado", promovida por determinados poluentes, é importante lembrar que processos mutagênicos e carcinogênicos podem ser iniciados por lesões em DNA causadas por HO₂[•], H₂O₂ e HO[•] ^{24,25}. Se nossos resultados têm alguma relação causa-efeito com a alta incidência de malformações congênitas em Cubatão, divulgada pela imprensa e por alguns pesquisadores, nada podemos afirmar com os dados disponíveis no presente. Um grande volume de trabalho experimental, tempo e apoio financeiro terão de ser canalizados para a investigação e esclarecimento destes graves problemas.



Esquema 3 Relação entre oxidação de hemoglobina e danos na molécula de DNA.

Naoum e colaboradores¹⁸ verificaram recentemente que residentes de Cubatão exibem alta frequência de metemoglobinemia (~33%) e sulfoemoglobinemia (~35%), apresentam células vermelhas com hipocromia (~44%) e mesmo inclusões de Heinz (~14%). Nenhuma anormalidade, entretanto, foi revelada no exame de amostras de sangue do grupo controle-residentes de São José do Rio Preto. Estes autores atribuíram os distúrbios encontrados em Vila Parisi ao alto nível de poluição industrial em Cubatão: o amplo espectro de poluentes funcionalmente diferentes lançado em

Referências:

- 1 "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation", O. Hayaishi, ed., Academic Press, New York, 1974.
- 2 "Superoxide and Superoxide Dismutase", A. M. Michelson, J. M. McCord e I. Fridovich, eds., Academic Press, London, 1977.
- 3 "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen", O. Hayaishi e K. Asada, eds. University Park Press, Tokyo, 1977.
- 4 "Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology", M. A. J. Rodgers e E. L. Powers, eds., Academic Press, New York, 1981.

- ⁵ "Pathology of Oxygen", A. P. Autor, ed., Academic Press, New York, 1982.
- ⁶ Hoffman, M., J. B. Stevens e A. P. Autor, "Adaptation to Hyperoxia in the Neonatal Rat: Kinetic Parameters of the Oxygen-Mediated Induction of Lung Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase", *Toxicology*, **16**, 215-225 (1980).
- ⁷ Chow, C. K. e A. L. Tappel, "An Enzymatic Protective Mechanism Against Lipid Peroxidation Damage to Lungs of Ozone-Exposed Rats", *Lipids*, **7**, 518-524 (1972).
- ⁸ Reddy, K. e A. L. Tappel, "Effect of Dietary Selenium and Autoxidized Lipids on the Glutathione Peroxidase System of Gastrointestinal Tract and Other Tissues in the Rat", *J. Nutr.*, **104**, 1069-1078 (1974).
- ⁹ Medeiros, M. H. G., P. E. Marchiori e E. J. H. Bechara, "Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Catalase Activities in the Erythrocytes of Patients with Intermittent Acute Porphyria", *Clin. Chem.*, **28**, 242 (1982).
- ¹⁰ Babior, B. M. "The Role of Active Oxygen in Microbial Killing by Phagocytes", em Ref. 5, 45-56.
- ¹¹ Oyanagui, Y., "Macrophage-Generated Superoxide Radicals: Inflammation and Tumor Cell Growth", em Ref. 5, 99-113.
- ¹² Oberley, L. W. e G. R. Buettner, "Role of Superoxide Dismutase in Cancer", *Cancer Res.*, **39**, 1141-1149 (1979).
- ¹³ Michelson, A. M., "Clinical Use of Superoxide Dismutase and Possible Pharmacological Approaches", em Ref. 5, 277-302.
- ¹⁴ Gerli, G. C., L. Beretta, M. Bianchi, A. Pellegatte e A. Agostini, *Scand. J. Haematol.*, **25**, 87-92 (1980).
- ¹⁵ Edsmyr, F., "Superoxide Dismutase Efficacy in Ameliorating Side Effects of Radiation Therapy: Double-Blind, Placebo-Controlled Trials in Patients with Bladder and Prostate Tumors", em Ref. 5, 315-326.
- ¹⁶ Yamanaka, N., K. Ota e K. Utsumi, "Changes in Superoxide Dismutase Activities During Development, Aging, and Transformation", em Ref. 3, 183-188.
- ¹⁷ Michelson, A. M., K. Puget, P. Durosay e J. C. Bouneau "Clinical Aspects of the Dosage of Erythrocyte", em Ref. 5, 467-499.
- ¹⁸ Naoum, P. R., Celso A. Mourão, Milion A. Ruiz e Adelino Poli Neto, "Toxic Methaemoglobinaemia and Sulphaemoglobinaemia in a Population from Cubatão (S.P., Brazil): Effect of Industrial Pollution?", *An. Acad. Bras. Ciências*, in press.
- ¹⁹ Maral, J., K. Puget e A. M. Michelson, "Comparative Study of Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Levels in Erythrocytes of Different Animals", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1525-1535 (1977).
- ²⁰ Birbaum, Z. W. e F. H. Tingey, "One-Sided Confidence Contours for Probability Distribution Functions", *Ann. Math. Statist.*, **22**, 592-596 (1951).
- ²¹ Carrell, R. W., C. C. Winterbourn e E. Rachmilewitz, "Activated Oxygen and Haemolysis", *Brit. J. Haematol.*, **30**, 259-264 (1975).
- ²² Williamson, D., C. C. Winterbourn, W. H. Swallow e A. W. Misen, "Oxidative Hemoglobin Breakdown Induced by a Rubber Additive", *Hemoglobin*, **5**, 73-84 (1981).
- ²³ Flohé, L. e W. Schlegel, "Glutathione Peroxidase. IV. Intrazelluläre Verteilung des Glutathion-Peroxidase Systems in der Rattenleber", *Hope Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1401-1410 (1971).
- ²⁴ Hoffmann, M. E. e R. Meneghini, "DNA Strand Breaks in Mammalian Cells Exposed to Light in the Presence of Riboflavin and Tryptophan", *Photochem. Photobiol.*, **29**, 299-303 (1979).
- ²⁵ Smith, K. C., "Photobiology and Photomedicine. The Future is Bright", *J. Invest. Dermatol.*, **77**, 2-7 (1981).

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisas Tecnológicas (CNPq). Agradecemos ao Prof. Dr. Paulo C. Naoum pela colaboração na interpretação dos resultados e ao Dr. Giuseppe Cilento pelo contínuo estímulo e cooperação. A realização deste trabalho não seria possível sem a cooperação da Polícia Militar do Estado de São Paulo, da Prefeitura Municipal de Cubatão, e dos voluntários que se prontificaram às doações.

ARTIGO

RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA NOS FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS.

Alba Josefina Riera de Narváez*

Rec. 25/04/83

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomíase é uma doença em franca expansão, devido às condições ecológicas favoráveis à situação precária

de saneamento e ao baixo nível sócio-econômico de alguns países, infectando gravemente cerca de 250 milhões de pessoas em todo o mundo.

Dentre as três espécies que parasitam o homem (*S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mansoni*), a esquistossomíase mansônica, bilharziose, ou bilharzíase mansônica ou intestinal, ou doença de Manson-Pirajá da Silva, deve ser considerada de grande importância em razão dos prejuízos que

* Professora Associada do Departamento de Química Orgânica e Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidad de Los Andes, Mérida - Venezuela.