

## *Malondialdeído e grupo sulfidrilado como biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico*

Yenly G. Pérez<sup>1</sup>, Lissett Caridad González Pérez<sup>1</sup>, Rita de Cássia M. Netto<sup>2</sup>, Domingos S. N. de Lima<sup>3</sup>, Emerson S. Lima<sup>4</sup>

### RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune de origem desconhecida, associada ao estresse oxidativo. O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de estresse oxidativo em pacientes com LES recém-diagnosticado. Pacientes com LES (n = 36) e controles (n = 28) foram incluídos no estudo. Amostras de sangue foram usadas para dosagem de malondialdeído (MDA), grupo sulfidrilado (SH) e ácido úrico no soro. Os níveis de MDA ( $\mu\text{mol/L}$ ) foram maiores nos pacientes ( $3,9 \pm 2,6$ ) que nos controles ( $1,6 \pm 2,6$ ). Os níveis de SH foram significativamente menores nos pacientes. Os achados sugerem que o MDA pode ser um bom marcador de estresse oxidativo no LES.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo, antioxidantes, lúpus eritematoso sistêmico, ácido úrico.

© 2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica caracterizada por amplo espectro de manifestações clínicas, com produção de diversos autoanticorpos e deposição de complexos imunes fixadores de complemento, resultando em lesão dos tecidos.<sup>1</sup> Embora a causa específica do LES seja desconhecida, vários estudos associam a doença a imunidades celular e humoral defeituosas, provavelmente influenciadas por fatores genéticos, ambientais e hormonais.<sup>2,3</sup>

Acredita-se que radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio/nitrogênio/cloro contribuam para a ocorrência de várias doenças crônicas, causando estresse e lesão oxidativos. As doenças em que a lesão oxidativa foi implicada são câncer, aterosclerose, doença de Alzheimer, *diabetes mellitus* e doenças autoimunes.<sup>4-8</sup>

Muitos estudos clínicos se concentram na mensuração da lesão oxidativa mediante o uso de biomarcadores – oxidantes e antioxidantes. O malondialdeído (MDA), um produto da oxidação da lipoperoxidação, tem sido detectado em níveis

elevados em várias doenças.<sup>9</sup> Os grupos sulfidrilado (SH) são considerados os maiores e mais frequentes antioxidantes no plasma.<sup>10</sup> Diversos estudos experimentais apontam para um papel qualitativa e quantitativa importante do ácido úrico como substância antioxidante, funcionando como eliminador de radicais livres e quelador de íons metálicos temporários, que são convertidos em formas pouco reativas.<sup>11</sup>

A finalidade deste estudo foi determinar a presença de estresse oxidativo em pacientes com LES, mediante a determinação desses biomarcadores nas amostras de sangue. Os parâmetros foram correlacionados com atividade da doença e comorbidades; os resultados foram comparados com indivíduos normais no grupo-controle.

O estudo abrangeu 36 pacientes com LES e 28 voluntários saudáveis (controles) com idades entre 10 e 56 anos. O diagnóstico baseou-se em pelo menos quatro dos 11 critérios diagnósticos estabelecidos pelo *American College of Rheumatology (ACR)*.<sup>12</sup> Todos os pacientes estavam em

Recebido em 07/09/2011. Aprovado, após revisão, em 08/05/2012. Os autores declaram a inexistência de conflito de interesse. Suporte Financeiro: FAPEAM, CNPq. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

1. Aluno de Medicina, Universidade Federal do Amazonas – UFAM

2. Pós-graduando, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia – UFU

3. Doutor; Médico Reumatologista, Hospital Universitário Getúlio Vargas

4. Doutor; Professor-Adjunto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UFAM

Correspondência para: Emerson S. Lima. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas. CEP: 69010-300. Manaus, AM, Brasil. E-mail: eslima@ufam.edu.br

tratamento, e a atividade da doença foi avaliada pelo *Systemic Lupus Erythematosus Disease Active Index* (SLEDAI, do inglês, Índice de Atividade da Doença em Lúpus Eritematoso Sistêmico). A doença era considerada ativa quando SLEDAI > 6.<sup>13</sup> O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal do Amazonas (CAAE n. 0043.0.115.000.08). Todos os participantes (pacientes e controles) assinaram consentimento informado antes de tomar parte no estudo, e responderam a um questionário padronizado para fatores demográficos.

A coleta de sangue venoso (10 mL) de cada participante foi realizada com um sistema de tubos a vácuo (BD Vacutainer® System), com centrifugação (800 g, 15 min). O soro foi utilizado para determinar os marcadores bioquímicos e imunológicos.

O MDA foi determinado por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC); os cromatogramas foram monitorados a 532 nm e a concentração das amostras foi determinada em  $\mu\text{mol/L}$ .<sup>14</sup> O ácido úrico foi medido usando um analisador espectrofotométrico Cobas Mira® (Roche Instruments Inc.), com kits comercializados (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Os grupos SH foram determinados pelo método de Ellmans, modificado por Hu *et al.*<sup>15</sup> Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (DP). Utilizamos o teste *t* de Student para comparar os valores médios. Foram aplicadas correlações de Pearson e Spearman para correlacionar os parâmetros com SLEDAI.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

As características gerais e demográficas dos pacientes com LES e dos controles saudáveis estão apresentadas na Tabela 1. Não foi observada diferença entre duração, número de critérios e atividade da doença e estresse oxidativo ( $P > 0,05$ ).

O lúpus caracteriza-se pela agressão direta de autoanticorpos e pela deposição de complexos imunes fixadores de complemento, resultando em lesão dos tecidos associada ao

estresse oxidativo.<sup>16</sup> Waszczykowska *et al.*<sup>17</sup> sugeriram que os radicais livres intracelulares são capazes de induzir a síntese de citocinas que participam e modulam as respostas inflamatórias com a criação de radicais superóxido.

O estresse oxidativo, medido por níveis de MDA, estava aumentado em 78,9% ( $n = 30$ ) dos pacientes com LES, enquanto apenas 21,1% ( $n = 8$ ) dos controles apresentaram esse aumento (OR = 12,5; 95% IC 3,7–41,5). Conforme ilustrado na Tabela 2, observou-se que os níveis de MDA estavam significativamente aumentados em pacientes com LES em comparação aos controles. Não foi observada diferença significativa entre os níveis de MDA e a duração da doença ou comorbidades. Níveis aumentados de MDA no soro<sup>18</sup> e nos eritrócitos<sup>19</sup> foram informados em pacientes com LES. Wang *et al.*<sup>20</sup> e Shah *et al.*<sup>21</sup> associaram uma resposta mais forte de estresse oxidativo com escores SLEDAI mais altos, achado similar ao relato de Tewthanom *et al.*<sup>18</sup> No entanto, não identificamos, em nosso estudo, a associação dos níveis de MDA ou de SH com escores SLEDAI. Os altos níveis de MDA em pacientes com LES indicam que a membrana celular lipídica foi atacada, e que o MDA pode ser um bom marcador de estresse oxidativo nessa doença.

Não ocorreu alteração significativa nos níveis séricos de ácido úrico em pacientes com LES, em comparação aos controles ( $4,1 \pm 1,5$  e  $3,8 \pm 0,9$  mg/dL, respectivamente). Não foi observada correlação entre os níveis séricos desse composto e atividade da doença. Deminice *et al.*<sup>22</sup> associaram o ácido úrico como resposta de biomarcador de estresse oxidativo a uma sessão aguda tradicional de *interval training* e de *circuit training* com resistência à hipertrofia. Mas Ikeda *et al.*<sup>23</sup> não puderam estabelecer a mesma associação, quando o estresse oxidativo foi observado em pacientes com esclerose lateral amiotrófica progressiva. Embora o ácido úrico seja considerado importante antioxidante, e embora seja esperado que seus níveis séricos fiquem mais baixos em pacientes com LES em comparação aos controles, em nosso estudo também não foi

**Tabela 1**

Características gerais e demográficas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e controles saudáveis

Dados gerais	LES (n = 36)	Controles (n = 28)
Idade	28,2 $\pm$ 13	27,9 $\pm$ 9,9
Gênero (feminino)	33 (91,6%)	28 (100%)
ACR, número	5,3 $\pm$ 1,1	NA
TD (mês)	5,9 $\pm$ 3,5	NA
SLEDAI, número	10,3 $\pm$ 6,6	NA

ACR: American College of Rheumatology; TD: tempo da doença; NA: não aplicável. Os valores estão expressados como média  $\pm$  DP.

**Tabela 2**

Comparação entre os parâmetros de oxidantes e de antioxidantes em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e em controles saudáveis

Média	LES (n = 36)	Controle (n = 28)	P*
MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	3,9 $\pm$ 2,6	1,6 $\pm$ 2,6	0,001
Grupo SH ( $\mu\text{mol/L}$ )	260,2 $\pm$ 182,7	339,4 $\pm$ 104,3	0,04
Ácido úrico (mg/dL)	4,1 $\pm$ 1,5	3,8 $\pm$ 0,9	0,48

LES: lúpus eritematoso sistêmico; MDA: malondialdeído; SH: sulfidrila. Os valores são expressados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

possível associar essa substância como um biomarcador de confiança de estresse oxidativo.

Morgan *et al.*<sup>24</sup> demonstraram que marcadores da oxidação proteica têm correlação com um estado de deterioração da doença em pacientes com LES. Em nosso estudo, observamos que os níveis do grupo SH estavam significativamente diminuídos em pacientes com LES em comparação aos controles ( $260,2 \pm 182,7$  versus  $339,4 \pm 104,3$   $\mu\text{mol/L}$ ), achado similar ao do estudo de Zhang *et al.*<sup>25</sup> Esse achado reforça o papel do estresse oxidativo na patogênese do LES.

Concluimos que pacientes com LES exibem aumento no estresse oxidativo. No entanto, essa resposta não está correlacionada à atividade da doença ou à sua duração. Os níveis de MDA e dos grupos SH podem ser utilizados como biomarcadores para medir o estresse oxidativo em pacientes com LES, enquanto o ácido úrico não pode ser utilizado com a mesma finalidade. Há ainda necessidade de novos estudos sobre estresse oxidativo e LES, para que aumente nossa compreensão da patogênese dessa doença.

## REFERENCES

### REFERÊNCIAS

- Karanam SA, Dharmavarapu PK, D Souza R, Upadhy S, Kumar V, Kedage V *et al.* Lúpus eritematoso sistêmico. In: Goldman L, Ausiello, Cecil D (eds.). *Tratado de medicina interna*. 22.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005, p.1937–47.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Adaptação, dano e morte celular. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins & Cotran (eds.). *Bases patológicas das doenças*. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005, p.17–9.
- Nery FG, Borba EF, Neto FL. Influence of the psychosocial stress on systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(5):355–61.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1):1–40.
- Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* 2008; 23(3):381–90.
- Zawia NH, Lahiri DK, Cardozo-Pelaez F. Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(9):1241–9.
- Chang YC, Chuang, LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res* 2010; 2(3):316–31.
- Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox influence on the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol* 2008; 48(1):17–24.
- Amara A, Constans J, Chaugier C, Sebban A, Dobourg L, Peuchant E *et al.* Autoantibodies to malondialdehyde-modified epitope in connective tissue diseases and vasculitides. *Clin Exp Immunol* 1995; 101:233–8.
- Kolagal V, Karanam SA, Dharmavarapu PK, D'souza R, Upadhy S, Kumar V *et al.* Determination of oxidative stress markers and their importance in early diagnosis of uremia-related complications. *Indian J Nephrology* 2009; 19(1):8–12.
- Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des* 2005; 11(32):4145–51.
- Surita FGC, Cecatti JG, Barini R, Parpinelli MA, Silva JLC. Lúpus e gravidez. *Rev Bras de Ginec e Obstetria* 1997; 19(6):413–7.
- Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ. Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in SLE. *Arthritis Rheum* 2005; 52(7):2069–79.
- Fukunaga K, Takama K, Suzuki T. High performance liquid chromatography determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Anal Biochem* 1995; 230(1):20–3.
- Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993; 121(2):197–8.
- Ferguson JD. Stress that causes palpitations: oxidative stress and atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009; 6(7):941–2.
- Waszczykowska E, Robak E, Wozniacka A, Narbutt J, Torzecka JD, Sysa-Jedrzejowska A. Estimation of SLE activity based on the serum level of chosen cytokines and superoxide radical generation. *Mediators of Inflammation* 1999; 8(2):93–100.
- Tewthanom K, Janwityanuchit S, Totemchokchayakarn K, Panomvana D. Correlation of lipid peroxidation and glutathione levels with severity of systemic lupus erythematosus: a pilot study from single center. *J Pharm Pharm Sci* 2008; 11:30–4.
- Turgay M, Durak I, Erten S, Ertugrul E, Devrim E, Avci A *et al.* Oxidative stress and antioxidant parameters in a Turkish group of patients with active and inactive systemic lupus erythematosus. *APLAR J Rheumatol* 2007; 10:101–6.
- Wang G, Pierangeli SS, Papalardo E, Ansari GA, Khan MF. Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. *Arthritis Rheum* 2010; 62(7):2064–72.
- Shah D, Kiran R, Wanchu A, Bhatnagar A. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: Relationship to Th1 cytokine and disease activity. *Immunol Letters* 2010; 129:7–12.
- Deminice R, Sicchieri T, Mialich MS, Milani F, Ovidio PP, Jordan AA. Oxidative stress biomarker response to an acute session of hypertrophy-resistance traditional interval training and circuit training. *J Strength Cond Res* 2011; 25(3):798–804.
- Ikeda K, Kawabe K, Iwasaki Y. Do serum acid reflect oxidative stress in the progression of ALS? *J Neurol Sci* 2009; 287(1–2):294.
- Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ. Evidence for chronically elevated serum protein oxidation in systemic lupus erythematosus patients. *Free Radic Res* 2009; 43:117–27.
- Zhang Q, Ye DQ, Chen GP, Zheng Y. Oxidative protein damage and antioxidant status in systemic lupus. *Eryth Clin Exp Dermatol* 2009; 35:287–94.