

RADICAIS LIVRES DO OXIGÊNIO EM MEDICINA (2.^a Parte)

L. M. CUNHA RIBEIRO

Centro de Fisiologia da Hemostase (INIC). Laboratório de Fisiologia Faculdade de Medicina do Porto. Porto

RESUMO

Um radical livre é uma estrutura química que contém um número ímpar de electrões, sendo por isso extremamente instável e muito reactiva. A formação de radicais livres de oxigénio ocorre durante o decurso de processos metabólicos quer fisiológicos quer patológicos. Este trabalho pretende rever de forma sintética mas sistemática alguns conceitos físico-químicos relevantes para a compreensão da bioquímica dos radicais livres, dos mecanismos envolvidos na sua formação, das reacções químicas a que os mesmos dão origem, bem como dos sistemas endógenos de defesa contra esses radicais. Finalmente, aborda-se de forma crítica o papel dos radicais livres de oxigénio na biologia do envelhecimento, na carcinogénese, na lesão de reperfusão e na síndrome de dificuldade respiratória do adulto.

SUMMARY

Oxygen radicals in medicine

Free radicals are highly reactive molecules, and therefore transient, which have an odd number of electrons and are generated *in vivo* as byproducts of normal metabolism. In this review we survey basic concepts on the chemistry of oxygen free radicals, their cellular sources and the reactions they can undergo. We also discuss the cellular defenses against free radicals induced damage. The disfunction induced by free radicals may thus be a major component of several pathological conditions. The critical role played by free radicals in ageing, carcinogenesis, reperfusion injury and respiratory distress is reviewed.

MECANISMOS DE DOENÇA E RADICAIS LIVRES

Embora a repercussão na prática clínica dos radicais livres de oxigénio seja ainda muito reduzida, inúmeras são as situações em que aqueles invadiram os conceitos de fisiopatologia, se bem que na maioria dos casos, os estudos ainda se encontrem na fase experimental.

Envelhecimento

Os mecanismos bioquímicos do envelhecimento têm sido objecto das mais variadas teorias. No entanto, a maioria das mesmas nunca passou de pura especulação sem a menor base científica sólida.

Em 1956 D. Harman propôs que fármacos capazes de proteger os organismos contra os efeitos da radiação, prolongariam a vida média desses organismos¹⁴², e demonstrou a sua teoria em ratos que tratou com um *scavenger*, a mercaptoetilamina¹⁴³. Mas apesar da caracterização do superóxido como produto da radiólise da água oxigenada já ser do conhecimento da química da radiação¹⁴⁴, só em 1968 as implicações daquele facto chegaram à bioquímica, com a descoberta de que o superóxido podia formar-se durante uma oxidação enzimática¹⁴⁵.

Ao longo da vida de um organismo alguns radicais iludem os sistemas de defesa, provocando mutações genéticas, alterações de moléculas essenciais aos sistemas de controlo e perturbações das membranas. Uma teoria propõe que essas alterações estão na base do processo de envelhecimento¹⁴⁶. Diversas observações sustentam este ponto de vista. O envelhecimento acompanha-se de alterações oxidativas do material genético¹⁴⁷, do colagénio¹⁴⁸, da elastina¹⁴⁹, bem como do acumular de pigmentos resultantes da polimerização de lípidos através de reacções oxidativas, como a lipofuscina e ceróides^{30,150}. Estes pigmentos (*age pigments*) são insolúveis e acumulam-se nos lisossomas não sendo degradados. O seu aparecimento correlaciona positivamente com o conteúdo na dieta em ácidos gordos polinsaturados, e, negativamente, com uma dieta rica em antioxidantes¹⁵¹. Estas alterações reduzem a capacidade do organismo se adaptar e por isso resistir a perturbações ambientais. Além disso, uma diminuição dos sistemas defensivos com a idade pode acelerar as agressões oxidativas, o que é corroborado pelo facto de que em ratos idosos a superóxido dismutase é menos estável e menos activa do que em ratos jovens¹⁵². No entanto, nem todos os animais apresentam estas alterações¹⁵³. No coração e no cérebro de indivíduos idosos a actividade da superóxido dismutase não está diminuída mas acumulam-se formas inativas da enzima^{154,155}. Também no fígado¹⁵⁶, cristalino¹⁵⁷, e eritrócitos de animais velhos se observou uma diminuição da

Recebido para publicação: 28 de Dezembro de 1987.

atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase, o que implica uma diminuição na capacidade de regenerar o NADPH (ver sistema do glutatião)^{158,159}. Por outro lado, a vida média de células humanas em cultura pode ser aumentada baixando o pO₂¹⁶⁰, ou adicionando vitamina E ao meio de cultura¹⁶¹.

A esperança máxima de vida de uma espécie encontra-se codificada no seu material genético, porém, a vida média é razoavelmente inferior. Experiências em ratinhos demonstraram que os antioxidantes aumentam a vida média não influenciando contudo a vida máxima¹⁴⁶. A terapêutica pelos antioxidantes parece também desacelerar a diminuição da actividade do sistema imunológico que acompanha a idade, e reduzir a incidência de doenças malignas¹⁶². O eritrócito revelou-se um bom modelo para estudar os efeitos do envelhecimento celular, pois tem uma vida média fixa e é incapaz de sintetizar proteínas; além disso, dado que o eritrócito aumenta a densidade com o envelhecimento, permite facilmente separar populações em função da idade. Usando este modelo, foi possível determinar que o conteúdo em GSH de eritrócitos de ratos idosos está diminuído quando comparado com o de ratos jovens, o que poderá explicar, em parte, a sua menor vida média¹⁶³. Comparando a actividade em glutatião peroxidase, glutatião reductase, catalase e glicose 6-fosfato desidrogenase de eritrócitos velhos com eritrócitos novos, aquela está globalmente diminuída nos primeiros¹⁵⁹. Mas mais importante é o facto da actividade destas enzimas estar diminuída na população idosa¹⁵⁹ quando se compara com eritrócitos da mesma idade obtidos de ratos jovens. A actividade da superóxido dismutase encontra-se também consideravelmente reduzida em eritrócitos velhos e mais uma vez a sua actividade está diminuída em função da idade do dador¹⁶⁴.

A alteração de uma proteína da membrana do eritrócito do rato (banda 3) parece ser responsável pelo reconhecimento por auto-anticorpos tipo IgG e subsequente sequestração por fagocitose de eritrócitos velhos¹⁶⁵. Em ratos jovens, esta proteína só se encontra alterada em eritrócitos velhos, mas em ratos idosos é possível encontrar a proteína alterada em eritrócitos de todas as idades¹⁵⁸. É possível que a agressão oxidativa aos componentes da membrana de eritrócitos de ratos idosos seja responsável por aquele facto^{159,166}.

Se os antioxidantes evitam de forma eficaz as acções deletérias dos radicais livres, ou se se limitam a minimizar as lesões resultantes da acção desses radicais¹⁶⁷, sem com isso alterar o curso normal do processo de envelhecimento¹⁵⁵, é um ponto fundamental que permanece por esclarecer completamente, apesar da evidência actual apontar para a primeira hipótese.

Cancro

O desenvolvimento de técnicas experimentais sofisticadas, permitiu o estudo do papel desempenhado pelos radicais livres em diversas áreas da patologia, nomeadamente na carcinogénese. Embora exista abundante evidência para um envolvimento dos radicais livres na iniciação e promoção de tumores^{168,169}, é necessário ser-se extremamente crítico na apreciação dos resultados.

A abordagem experimental do papel dos radicais livres na transformação de uma célula normal numa célula maligna consiste normalmente no uso de diversos anti-oxidantes e na observação da sua acção em inibir etapas do processo de carcinogénese^{170,171}. Porém, o facto de diversos mecanismos celulares, críticos para o funcionamento normal de uma célula, sofrerem alterações profundas no decorrer da carcinogénese, e de algumas dessas alterações poderem ser induzidas através da acção dos radicais livres^{172,173}, contribui para suportar o envolvimento dos radicais livres na carcinogénese.

É assim que a formação de peróxidos de lipídeo podem estimular a guanil-ciclase, e em certos tipos celulares o aumento de GMPc provoca um aumento do índice mitótico¹⁷⁴. Também a peroxidação da membrana nuclear altera a fluidez desta, perturbando o movimento do ARNm¹⁷⁵. Algumas enzimas da membrana plasmática dependentes de fosfolipídeos, são também afectadas pela peroxidação destes; estão neste caso a ATPase Na⁺-K⁺ e adenil ciclase. A inibição destas enzimas devido à peroxidação de lipídeos de membrana conduz a importantes alterações dos gradientes iónicos¹⁷⁶ e a uma queda do AMPc¹⁷⁷, de onde resultam respectivamente alterações nos processos de síntese celular de macromoléculas¹⁷⁸ e alterações nos processos de diferenciação de alguns tipos celulares¹⁷⁹.

Finalmente, certos carcinogénios químicos são activados no retículo endoplasmático, num processo que requer a presença de hidroperóxidos de lipídeo^{173,180}, implicando por isso a presença prévia de certos radicais livres. Além disso, muitos carcinogénios são eles próprios radicais livres ou são activados no organismo em radicais livres^{181,182}.

O facto de que linhas celulares neoplásicas em comparação com células normais contêm níveis inferiores de superóxido dismutase que contém Mn¹⁸³, pode condicionar a produção destas células malignas em ácido láctico¹⁸⁴, já que esta superóxido dismutase se encontra a nível mitocondrial.

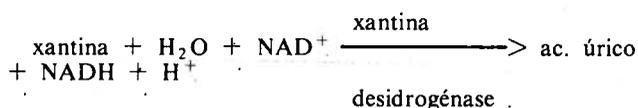
O aumento de sensibilidade das células neoplásicas quer à radiação quer a certa terapêutica citostática, cujo mecanismo de acção pode envolver a geração de radicais livres de oxigénio, poderá ter como explicação, pelo menos em parte, uma diminuição dos mecanismos de defesas contra os radicais livres¹⁸⁵. No entanto, como certas células neoplásicas são muitas vezes hipóxicas¹⁸⁶, o efeito anterior pode ser contrariado, o que é corroborado por certos estudos que defendem que as células malignas estão melhor protegidas contra os radicais livres do que as células normais¹⁸⁷. Por outro lado, tecido maligno de cérvix humano produz maiores quantidades de radicais livres do que tecido normal¹⁸⁸. Se isto é uma consequência do processo de desenvolvimento da neoplasia, se é uma cause ou se pelo contrário é um mecanismo de defesa do próprio organismo que colabora na destruição das células neoplásicas, é ainda hoje desconhecido.

Lesão de reperfusão

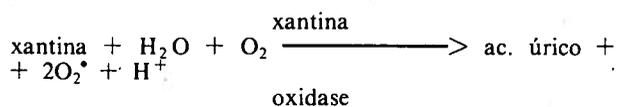
A isquemia é o principal responsável pela mortalidade e morbidade associada à doença cardíaca e ao acidente vascular cerebral. Assim, um objectivo primordial do tratamento daquela patologia é o reestabelecimento do aporte sanguíneo às áreas dele privadas. Estratégias farmacológicas (vasodilatadoras, bloqueadores do cálcio, agentes trombolíticos) e cirúrgicas (*bypass* coronário, angioplastia, etc.) têm sido utilizadas com a finalidade de alcançar aquele objectivo. Paradoxalmente a reperfusão de um tecido isquémico é ela própria geradora de situações patológicas, por vezes graves, contribuindo para a morbidade e mesmo para a mortalidade do processo desencadeador. Existe hoje evidência directa e indirecta, experimental e clínica¹⁸⁹⁻¹⁹¹, de que o restabelecimento da oxigenação a um tecido isquémico se acompanha da geração de radicais livres de oxigénio¹⁹⁰, sendo estes responsáveis, pelo menos em parte, pelas lesões induzidas pela reperfusão¹⁸⁹.

A administração de superóxido dismutase e catalase a corações de coelho isolados e perfundidos, nos quais foi induzida isquemia por um período de 2 horas a 27°C, melhora diversos parâmetros hemodinâmicos na fase de reperfusão, quando comparado com os controlos¹⁹². Porém, indicadores bioquímicos da gravidade da lesão, como a libertação de desidrogenase láctica, não mostraram diferença entre o grupo tratado com as enzimas e os controlos. Num

outro estudo, foram adicionados a uma solução cardioplégica superóxido dismutase e manitol¹⁹³. Também neste caso todos os parâmetros hemodinâmicos estudados, melhoraram no grupo tratado. Além disso, neste grupo verificou-se um aumento significativo da recaptação de cálcio por parte do retículo sarcoplasmático¹⁹³. Usando um modelo experimental de isquemia cardíaca localizada, verificou-se que a administração de superóxido dismutase e de alopurinol se traduzia por um efeito protector do miocárdio lesionado¹⁹⁴. Não sendo o alopurinol um *scavenger*, o seu efeito benéfico na isquemia de reperfusão, parece explicar-se pela inibição da oxidase da xantina. Esta enzima parece ser o principal responsável pela formação de superóxido no tecido pós-isquémico¹⁹⁵. No tecido normal, cerca de 90% da actividade desta enzima é atribuída à desidrogenase da xantina (tipo D). Esta cataliza a formação de ácido úrico, reduzindo o NAD^+ e utilizando a xantina ou a hipoxantina como substrato (Eq. 25).



Porém a conversão da desidrogenase (tipo D) na oxidase (tipo O), conduz na mesma à formação de ácido úrico, mas através da redução do oxigénio molecular com formação de superóxido (Eq. 26).



A conversão do tipo D da enzima em tipo O verifica-se em tecidos isquémicos. Várias observações sugerem que aquela conversão se deve à activação de uma protease do citosol¹⁹⁵, sendo esta activada por um aumento na concentração do cálcio no citosol com concomitantemente activação da calmodulina¹⁹⁶. A depleção em ATP numa célula isquémica, impede esta de manter os gradientes iónicos, obrigando a uma redistribuição do cálcio, normal concentrado nas mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático. Por outro lado, a depleção em ATP conduz a um aumento dos níveis de AMP. Este é catabolizado em adenosina, inosina e finalmente em hipoxantina, servindo esta última de substrato para a oxidase da xantina.

A mais elevada concentração em desidrogenase da xantina encontra-se nas vilosidades da mucosa do intestino. Este tecido quando isquemiado é capaz de converter praticamente toda a desidrogenase da xantina em oxidase da xantina em cerca de dez segundos^{197,198}. A reperfusão de tecido intestinal isquémico acompanha-se de um aumento da permeabilidade vascular intestinal¹⁹⁷. Esta pode ser impedida pela administração de superóxido dismutase¹⁹⁹ e de alopurinol¹⁹⁸.

O grau de conversão de desidrogenase da xantina em oxidase da xantina é variável consoante o tecido em causa. No coração a concentração da oxidase duplica ao fim de oito minutos de isquemia, enquanto que no fígado um aumento semelhante só se verifica ao fim de trinta minutos¹⁹⁵.

O superóxido formado por acção da oxidase da xantina pode estar na origem da formação do radical hidroxilo, e daí, a acção protectora do manitol em certos modelos experimentais de reperfusão.

Em síntese, pode afirmar-se que a reintrodução do oxigénio molecular num tecido isquémico, acompanha-se da formação de radicais livres de oxigénio, sendo estes responsáveis pelo desencadear de diversos processos de lesão celular, que no seu conjunto se traduzem na designada lesão de reperfusão.

Lesões teciduais relacionadas com a activação leucocitária

A acção bactericida dos leucócitos polimorfonucleares é acompanhada de um rápido e intenso consumo de oxigénio, que se traduz na produção de grandes quantidades de radicais de oxigénio, essencialmente superóxido²⁰⁰. Este facto é de grande importância na regulação do processo inflamatório agudo na medida em que condiciona alterações da permeabilidade vascular²⁰¹ e na génese de factores quimiotáticos²⁰².

O facto da superóxido dismutase exibir propriedades anti-inflamatórias em vários modelos experimentais de inflamação, corrobora o ponto de vista de que o superóxido desempenha um importante papel nas manifestações clínicas da inflamação^{28,204}.

A formação de radicais livres de oxigénio por leucócitos activados tem sido, pelo menos em parte, corresponsabilizada na patogénese de variadas situações clínicas, como a artrite reumatóide⁹ e a síndrome de dificuldade respiratória do adulto (adult respiratory distress syndrome — ARDS)²⁰⁵. Este último é uma lesão pulmonar aguda caracterizada por edema pulmonar na presença de uma pressão de encravamento normal. Afecta indivíduos com pulmões previamente normais, seguindo-se normalmente a um processo grave como choque ou trauma, e apresenta uma mortalidade de cerca de 50%²⁰⁵.

O quadro patomorfológico do ARDS caracteriza-se por sequestração de neutrófilos na árvore vascular pulmonar bem como migração daqueles para o espaço intersticial e alveolar²⁰⁶. Modelos experimentais de agressão pulmonar induzida por endotoxina demonstraram que o desenvolvimento de edema pulmonar não cardiogénico correlaciona com a sequestração de leucócitos no pulmão²⁰⁷. Além disso, em animais tornados neutropénicos antes da infusão de endotoxina não se desenvolve o quadro de edema pulmonar²⁰⁸. Estas e outras observações sugerem que o neutrófilo desempenha um importante papel no desencadear do quadro de ARDS.

Os neutrófilos respondem a diversas substâncias que condicionam a migração dos mesmos. Essas substâncias, genericamente designadas por quimotaxinas, incluem componentes do complemento, derivados do ácido araquidónico, diversos peptídeos, etc.²⁰⁹. A infusão intravenosa em animais de experiência de plasma no qual o complemento foi activado, provoca uma intensa neutropenia, que se acompanha de hipoxemia, sendo os granulócitos sequestrados selectivamente no pulmão²¹⁰. A endotoxina é um potente activador da via alterna do complemento, e o mecanismo descrito poderá estar implicado na patogénese do ARDS secundário a septicemia²¹¹. Em qualquer das circunstâncias, os neutrófilos sequestrados libertariam superóxido que por sua vez daria origem à formação de outros radicais livres. Estes provocam variadas agressões no endotélio vascular pulmonar²¹², contribuindo não só para o aumento de permeabilidade vascular, mas também para a activação da cascata da coagulação e do sistema do complemento, devido à libertação de proteases pelo endotélio lesionado²¹³. Aqueles sistemas uma vez activados, funcionam como elementos amplificadores do processo patológico.

Evidência indirecta demonstrativa do papel dos radicais livres na patogénese do ARDS foi obtida através de experiências de perfusão de pulmão isolado em que se utilizaram neutrófilos obtidos de um paciente com doença granulomatosa crónica. Ao contrário do observado com neutrófilos normais, a activação dos neutrófilos do doente não conduziu a edema pulmonar²¹⁴. Também o uso da catalase e de um *scavenger* do radical hidroxilo, foi eficaz para impedir o desenvolvimento de edema pulmonar num modelo experimental de agressão do pulmão²¹⁵. Neste mesmo sistema a

superóxido dismutase foi ineficaz, o que sugere um não envolvimento directo do superóxido neste processo.

Em síntese, existem diversas observações que apontam para um papel dos radicais livres de oxigénio em vários modelos de agressão pulmonar, sugerindo fortemente o envolvimento desses radicais na patogenia do ARDS²¹⁶.

CONCLUSÃO

Perante o conjunto de efeitos tóxicos produzidos pelos radicais livres de oxigénio e necessitando os sistemas biológicos aeróbios de oxigénio para suportar a vida é legítimo perguntar: como conseguimos sobreviver? A resposta é dupla; por um lado a vida extremamente curta destes radicais, limita a sua esfera de acção a um microambiente muito limitado; por outro lado, a acção dos radicais livres não chega normalmente a manifestar-se devido ao desenvolvido e eficiente sistema de destruição que se encontra espalhado de forma ubíqua em todos os sistemas biológicos.

A desregulação, inibição ou destruição mesmo parcial deste sistema, por si só ou acompanhada de condições que favorecem a ocorrência de radicais livres leva ao aparecimento das perturbações metabólicas que condicionam certas manifestações patológicas.

Com esta breve revisão, pretende-se chamar a atenção para o papel potencial dos radicais livres de oxigénio em importantes áreas da medicina. Seleccionaram-se alguns exemplos que julgamos pertinentes, como a biologia do envelhecimento, o processo de carcinogénese, a lesão de repêrfusão e a síndrome de dificuldade respiratória do adulto. Trata-se de situações em que existe uma grande quantidade de informação que aponta para um papel preponderante daqueles radicais.

Julgamos que um conhecimento mais profundo da bioquímica dos radicais de oxigénio, permitirá abrir novos caminhos no conhecimento de vários mecanismos fisiopatológicos ainda mal conhecidos.

BIBLIOGRAFIA

142. HARMAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
143. HARMAN D. Free radical theory of aging: Effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF1 mice *J Gerontol* 1968; 23: 476-482.
144. CZAPSKI G. Radiation chemistry of oxygenated aqueous solutions *Ann Rev Chem* 1971; 22: 171-208.
145. McCORD J.M. and FRIDOVICH I The reduction of cytochrome c by milk xambine oxidase *J Biol Chem* 1968; 243: 5753-5760.
146. PRYOR W.A. — Free radicals in biology. The involvement of radical reactions in aging and carcinogenesis in: Pryor W.A. (ed). *Medicinal Chemistry* vol. 5, Elsevier 1977; pp 331-359.
147. OBERLEY L.W. and BUETTNER G.R. — Role of superoxide dismutase in cancer *Cancer Res* 1979; 39: 1141-1149.
148. LABILLA F.S. and PAUL G. — Structure of collagen from human tendon as influenced by age and sex *J Gerontol* 1965; 20: 54-59.
149. LABILLA F.S., VIVIAN S. and THORNHILL D.P. — Amino acid and composition of human aortic elastin as influenced by age *J. Gerontol* 1966; 21: 550-555.
150. SOHAL R.S. — Metabolic rate, ageing and lipofuscin accumulation in: Sohal R.S. (ed). *Age Pigments*, Elsevier, 1981; pp 1-14.
151. WESTERMARK T., SANTAVOURI P., MARKLUND S., et al. — Studies on the effects of selenium administration to neuronal lipofuscinosis patients in: Armstrong D., Koppang N. and Rider J.A. (eds), *Ceroid Lipofuscinosis (Batten's disease)*. Elsevier, 1982; pp 392-407.
152. MASSIE H.R., AIELLO V.R. and LODICE A.A. — Changes with age in copper and superoxide dismutase levels in brains of C57BL/6J mice *Mech age Dev*, 1979; 10: 93-99.
153. KELLOGG E.W. and FRIDOVICH I. — Superoxide dismutase in the rat and mouse as a function of age and longevity *J. Gerontol* 1976; 31: 405-408.
154. REZNICK A.Z., STEINHAGEN-THIESSEN E. and GERSHON D. — The effect of exercise on enzyme activities in cardiac muscles of mice of various age *Biochem Med* 1982; 28: 347-352.
155. GLASS G.A., LAVIE L., DOVRATA., et al — Further studies on SOD function and properties in different tissues of animals of various ages in Greenwald RA and Cohen G (ed). *Oxy Radicals and their Scavenger*, vol II. Elsevier pp 1983; 1-10.
156. LAVIE L., REZNICK A.Z. and GERSHON D. — Decreased protein and pyromycinylpeptide degradation in livers of senescent mice *Biochem J*. 1982; 202: 47-51.
157. DOVRAT A. and GERSHON D. — Rat lens superoxide dismutase and glucose-6-phosphate dehydrogenase: studies on the catalytic activity and the fate of enzyme antigen as a function of age *Exp Eye Res* 1981; 33: 651-661.
158. GLASS G.A., GERSHON H. and GERSHON D. — The effect of donor and cell age on several characteristics of rat erythrocytes *Exp Hematol* 1983; 11: 987-995.
159. GLASS G.A. and GERSHON D. — Decreased enzyme protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging *Biochem J* 1984; 218: 531-537.
160. PACKER L. and FUCHR K. — Low oxygen concentration extends the life-span of cultured human diploid cells *Nature* 1977; 267: 423-425.
161. PRYOR W.A. — Free radical biology: xenobiotics, cancer and aging *Ann N Y Acad Sci* 1982; 393: 1-22.
162. GERSHON D. — Antioxidant agents and scavengers of active oxygen species. A possible means of decelerating the process of aging NATO ASI on Oxygen Radicals in Biological Systems. Braga, Portugal, 1-16 Setembro, 1985 (Abst.).
163. ABRAHAM E.C., TAYLOR J.F. and LANG C.A. — Influence of mouse age and erythrocyte age glutathione metabolism *Biochem J* 1978; 174: 819-825.
164. GLASS G.A. and GERSHON D. — Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: loss of superoxide dismutase activity with increases in catalytically defective forms *Biochem Biophys Res Comm* 1981; 103: 1245-1253.
165. KAY M.M.B. — Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ *Proc Natl Acad USA* 1975; 72: 3521-3525.
166. VAN DER ZEE J., DUBBELMAN TMAR and VAN STEVENINK J. Peroxide-induced membrane damage in human erythrocyte *Biochim Biophys Acta* 1985; 818: 38-44.
167. HARMAN D: — The ageing process *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7124-7128.
168. DEMOPOULOS HB. PIETRONIGRO DD. FLAMM ES. et al. — The possible role of free radical reactions in carcinogenesis *J. Environmental Pathol Toxicol* 1980; 3: 273-303.
169. VIAJE A., SLAGA T.J., WIOLER M., et al. Effects of anti-inflammatory agents on mouse skin tumor production, epidermal DNA synthesis, phorbol ester induced cellular proliferation and production of plasminogen activator *Cancer Res* 1977; 37: 1530-156.
170. SELIGMAN ML., MITAMURA JA. SHERA N., et al — Corticosteroid (methylprednisolone) modulation of photoperoxidation by ultraviolet light in liposomes *Photochem Photobiol* 1979; 29: 549-558.
171. ULLAND B.M., WESIBURGER J.H., YAMAMOTO R.S., et al. — Antioxidants and carcinogenesis: buty lated hydroxytoluene, but not diphenyl 1-p-phenyl lenediamine, inhibits cancer induction, by N-2 flurenyl-acetamide and by N-hydroxy n-2-flurenacetamide in rate *Food Cosmet Toxicol* 1973; 11: 199-207.
172. PIETRONIGRO D.D., JONES W.G.B., KALTY K., et al. — Interactio of DNA and liposomes as a model for membranemediated DNA damage *Nature* 1978; 267: 78-79.

173. COON M.J. — Oxygen activation in the metabolism of lipids, drugs and carcinogenesis *Nutr Rev* 1978; 36: 319-328.
174. VESELY D.L., WATSON B. and LEVELY G.S. — Activation of liver guanylate cyclase by paraquat: Possible role of superoxide anion *J. Pharmacol Exp Ther* 1979; 209: 162-164.
175. HERLAN G., GIESE G. and WUNDERLICH F. — Influence of nuclear membrane lipid fluidity on nuclear RNA release *Exp Cell Res* 1979; 118: 305-309.
176. FOURCANS B. — Role of phospholipids in transport and enzymic reactions *Adv Rev Biochem* 1975; 147-159.
177. FLAMM E.S., SCHIFFER J., VIAU A.T. — Alteration of cyclic adenosine monophosphate in cerebral ischemia *Stroke* 1978; 9: 400-402.
178. WENNER C.E., HACKNEY J., KIMELBERG H.K., et al — Membrane effects of phorbol esters *Cancer Res* 1974 24; 1731-1737.
179. MARCELO C.L. — Differential effects of cAMP and cGMP on in vitro epidermal cell growth *Exp Cell Res* 1979; 120: 201-210.
180. MILLER J. and MILLER E.C. — Chemical and enzymatic aspects of chemical carcinogen activation and metabolism in: *Chemical Carcinogenesis. POP Ts'o and JA DiPaolo (eds). New York, Marcel Dekker, 1974; pp 87-112.*
181. FRIED J. — One-electron oxidation of polycyclic aromatics as a model for the metabolic activation of carcinogenic hydrocarbons in: *Chemical Carcinogenesis. POP Ts'o and JA DiPaolo (eds). New York, Marcel Dekker, 1974; pp 197-215.*
182. REIGH D.L., STUART M. and FLOYD R.A. — Activation of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorence by rat mammary peroxidase *Experimentia* 1978; 34: 107-108.
183. PESKIN A.V., KOEN Y.M. and ZBARSKY I.B. — Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumours *FEBS Lett* 1977; 78: 41.
184. TAO POP, CASPARY W.J. and LORENTZON R.J. — The involvement of free radicals in chemical carcinogenesis in: *Pryor WA (eds) Free Radicals in Biology, vol. 3, Academic Press, pp 251-303; 1977.*
185. CERUTTI P.A. — Prooxidant states and Tumor promotion *Science* 1985; 227: 375-381.
186. KENNEDY K.A., TEICHER B.A., ROCKWELL S., et al — The hypoxic tumour cell. A target for selective cancer chemotherapy *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 1-8.
187. BURTON G.W., CHEESEMAN K.N., INGOLD K.U. et al — Lipid antioxidants as potential tumors protective agents *Biochem Soc Trans* 1983; 11: 261-262.
188. BENEDETTO C., BOCCI A., DIANTANI M.U. et al — Electron spin resonance studies on normal human uterus and cervix and on benign and malignant uterine tumors *Cancer Res* 1981; 41: 2936-2942.
189. McCORD J.M. — Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
190. McDONAGH, P.F. — The role of the coronary microcirculation in myocardial recovery from ischemia *The Yale J Biol Med* 1983; 56: 303-311.
191. GAUDUEL Y. and DUVELLEROY M.A. — Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation *J Mol Coll Cardiol* 1984; 16: 459-470.
192. SHLAFFER M., KANE P.F. and KIRSH M.M. — Superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic, reperfused heart *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1982; 83: 830-839.
193. STEWART JR., BLACKWELL W.H., CRUTE S.L., et al — Prevention of myocardial ischemia/reperfusion injury with oxygen free-radical scavengers *Surg Forum* 1982; 33: 317-320.
194. CHAMBERS D.E., PARKS D.A., PATTERSON G., et al — Role of oxygen derived radicals in myocardial ischemia *Fed Proc* 1983; 47: 1093.
195. ROY R.S. and McCORD J.M. — Superoxide and ischemia: Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in: *Greenwald R.A. and Cohen G. (eds): Oxyradicals and their scavenger systems. Vol 2. Cellular and Medical Aspects, New York, Elsevier, 1983; pp. 145-153.*
196. SCHAFFER S.W., ROY and McCORD J.M. — Possible role for calmodulin in calcium paradox-induced heart failure *Eur Heart J* 1983; 4: Suppl H: 81-87.
197. GRANGER D.N., SENNETT M., McLEARNEY P., et al — Effect of local arterial hypotension on cat intestinal capillary permeability *Gastroenterology* 1980; 79: 474-480.
198. PARKS D.A., BULKLEY G.B. and GRANGER D.N. — Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases *Surgery* 1983; 94: 415-422.
199. GRANGER D.N., RUTILI G. and McCORD J.M. — Superoxide radicals in feline intestinal ischemia *Gastroenterology* 1981; 81: 22-29.
200. BABIOR B.M., KIPNES R.S. and CURNETTE J.T. — Biological defense mechanisms. The production by leucocytes of superoxide, a potential bactericidal agent *J Clin Invest* 1973; 52: 741-744.
201. DeI MAESTRO R.F., THAW H.H., BLOCK J., et al — Free radicals as mediators of tissue injury *Acta Physiol Scand* 1980; 492 Suppl. 43-57.
202. McCORD J.M., WONG K., STOKES S.H., et al — Superoxide and inflammation: a mechanism for the anti-inflammatory activity of superoxide dismutase *Acta Physiol Scand* 1980; 492 Suppl. 25-30.
203. McCORD J.M. — Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase *Science* 1974; 185: 529-531.
204. HUDSON L.D. — Adult respiratory distress syndrome *Semin Respir Med* 1981; 2: 99-174.
205. PRATT P.C. — Pathology of adult respiratory syndrome in: *WM Thurlbeck and MR Abell (eds). The Lung: structure, function and disease. Williams & Williams, 1978; pp 43-47.*
206. BRIGHAM K., BOWERS R. and HAYNES J. — Increased sheep lung vascular permeability caused by E. Coli endotoxin *Circ Res* 1979; 45: 292-297.
207. HEFLIN A.C. and BRIGHAM K.L. — Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia *J Clin Invest* 1981; 68: 1253-1260.
208. HAMMOND B., KONTOS H.A. and HESS M.L. — Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage *Can J Physiol Pharmacol* 1984; 63: 173-187.
209. O'FLAHERTY J.T., CRADDOCK P.S. and JACOB H.S. — Effects of intravascular complement activation on granulocyte adhesiveness and distribution *Blood* 1978; 51: 731-739.
210. SAUNDERS N.A. — Adult respiratory distress syndrome: mechanism of lung injury *Aust NZ Med* 1984; 14: 769-775.
211. SACKS T., MOLDOW C.F., CRADDOCK P.R., et al — Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes: an in vivo model of immune vascular damage *J Clin Invest* 1978; 61: 1161-1167.
212. JANOFF A., WHITE R., CARP H., et al — Lung injury induced by leucocytic proteases *Am J Pathol* 1979; 97: 111-135.
213. SHASBY D.M., VANBENTHUYSEN K.M., TATE R.M., et al — Granulocytes mediate acute edematous lung in jury in rabbits and isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: Role of oxygen radicals *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 443-447.
214. TATE R.M., VANBENTHUYSEN K.M., SHASBY D.M., et al — "Oxygen radical mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs" *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 802-806.
215. HOLCROFT J.W., VASSAR M.J. and WEBER CJO — Prostaglandin E1 and survival in patients with the adult respiratory distress syndrome *Ann Surg* 1986; 203: 371-378.

Pedido de Separatas:
 Dr. Luis Manuel Cunha-Ribeiro
 Laboratório de Fisiologia
 Faculdade de Medicina do Porto
 Hosp. S. João
 4200 PORTO