

Avaliação dos níveis de EC-SOD em voluntários utilizando o método de inibição da auto-oxidação da adrenalina

Assessment levels EC-SOD in volunteers using inhibition of epinephrine oxidation method

Fernanda Dapper Machado¹

César Augusto Miorelli Campos²

Tamiris Priscila Vingert³

Ana Luiza Ziulkoski⁴

Magda Susana Perassolo⁴

Resumo

Objetivo: Avaliar os níveis de EC-SOD em voluntários através do método de inibição da auto-oxidação da adrenalina e correlacionar com as características clínicas, bem como comparar com os resultados obtidos com o método de redução do WST-1. **Métodos:** Foram avaliados os níveis de SOD de 63 voluntários através do método de inibição da auto-oxidação da adrenalina e de redução do WST-1. **Resultados:** Não houve correlação entre os níveis de SOD com a idade ou sexo dos voluntários, porém o nível de SOD foi maior nos voluntários que utilizavam uma quantidade maior de medicamentos por dia. **Conclusão:** Não houve correlação entre os dois métodos de quantificação de SOD.

Palavras-chave

Estresse oxidativo; Epinefrina; Superóxido dismutase

INTRODUÇÃO

O desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e os antioxidantes do organismo, em decorrência de fatores como alimentação inadequada e sedentarismo, pode levar a uma condição chamada de estresse oxidativo (EO). O EO é um dos fatores desencadeantes de condições patológicas, como doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos, doenças pulmonares e envelhecimento precoce.^(1,2)

A defesa enzimática do organismo para as ROS são as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), entre outras enzimas redutoras. A SOD é conhecida como a primeira linha de defesa, catalisando a dismutação do ânio superóxido em peróxido de hidrogênio, posteriormente transformado em água e oxigênio pela CAT, GPx ou outras.⁽¹⁾

Nos organismos eucariotes podemos encontrar duas formas intracelulares da SOD: a Cu-Zn-SOD e a Mn-SOD (encontrada principalmente na matriz mitocondrial), além da forma extracelular da enzima, a EC-SOD.⁽³⁾ A presença de SOD em diferentes compartimentos é importante devido à incapacidade do superóxido de permear membranas e, portanto, necessitar ser eliminado no mesmo compartimento em que foi formado.⁽⁴⁾

A superóxido dismutase extracelular (SOD; EC 1.15.1.1) (EC-SOD ou SOD-3) controla o nível de superóxido no espaço extracelular, catalisando a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Além disso, a EC-SOD pode reagir com o peróxido de hidrogênio em uma reação peroxidase, a qual é conhecida por descontinuar sua atividade – podendo ser esse o mecanismo de controle da atividade enzimática. É expressa, principalmente, no pulmão e na musculatura vascular, mas também no coração, rins e placenta.⁽⁴⁻⁷⁾

Existem diferentes métodos para a quantificação ou determinação da atividade da EC-SOD, entre eles o método desenvolvido por Misra e Fridovich, em 1972,⁽⁷⁾ baseado na capacidade da enzima em inibir a auto-oxidação da adrenalina. Apesar da existência de técnicas mais modernas, alguns trabalhos ainda utilizam o método baseado na auto-oxidação da adrenalina, como o desenvolvido por Dries, em 2011,⁽⁸⁾ e por Soares, em 2012,⁽⁹⁾ sobretudo em razão do baixo custo da análise.

Zhou e Prognon⁽¹⁰⁾ acreditam que haverá um crescimento do interesse no campo das determinações enzimáticas, sobretudo em relação às antioxidantes e antiestresse, o que aumenta a necessidade de conhecimento dos níveis de SOD e outras enzimas antioxidantes

¹Farmacêutica. Bacharel em Farmácia/Universidade Feevale – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

²Bolsista de Iniciação Científica/Universidade Feevale – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

³Bacharel em Farmácia/Universidade Feevale – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

⁴Doutora/Universidade Feevale – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

Instituição: Universidade Feevale – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

Suporte Financeiro: Universidade Feevale e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

Artigo recebido em 17/07/2014

Artigo aprovado em 01/02/2016

na população e confirmam que estudos nesta área são fundamentais. Para se ter um entendimento a respeito dos processos redutores é necessário contar com informações quantitativas da geração e remoção de superóxido e peróxido de hidrogênio em células e tecidos.⁽¹¹⁾

Alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo ou a diminuição da proteção antioxidante estão relacionados com o avanço e a patologia de várias doenças, entre elas a esquizofrenia, a diabetes melito tipo 2, onde, além da diminuição dos níveis de SOD, ocorre a glicação da enzima ligada aos eritrócitos, levando a uma baixa atividade enzimática.^(12,13)

A comparação entre os resultados de SOD obtidos por diferentes métodos é uma tarefa difícil, uma vez que pequenas alterações nas condições do ensaio levam a grandes diferenças no resultado.⁽¹⁰⁾ A escassez de estudos populacionais que apontem o nível de SOD no plasma humano dificulta a comparação de resultados obtidos em diferentes populações. Diante do exposto, evidencia-se a importância deste trabalho, que pretende avaliar os níveis de SOD em um grupo de voluntários pelo método de inibição da auto-oxidação da adrenalina e relacioná-lo com as características clínicas, além de comparar com o método de redução do WST-1.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 63 participantes do projeto de pesquisa "Avaliação da relação entre qualidade de vida e estresse oxidativo em pacientes com diabetes melito tipo 2". Foram excluídos do estudo voluntários com doenças hepáticas ou renais. As análises laboratoriais, como glicose, glicohemoglobina, perfil lipídico e hemograma foram realizadas pelo Laboratório Escola de Biomedicina da Universidade Feevale. As características gerais e clínicas dos voluntários, como idade, sexo, tabagismo, patologias, consumo de medicamentos e alimentos antioxidantes, foram obtidas por meio de questionário próprio. As amostras de plasma para quantificação de EC-SOD foram armazenadas em temperatura de -80°C até o momento da análise.

Quantificação pelo método da auto-oxidação da adrenalina

Para a quantificação da SOD por meio do método baseado na inibição da auto-oxidação da adrenalina, as amostras foram diluídas em soro fisiológico, na proporção 1:10 (v/v), e quantidades crescentes do diluído (10, 15, 20, 25 e 30 ul) acrescidas de tampão glicina pH 10,2 a 32°C, solução de catalase e solução ácida de adrenalina; foram lidas em espectrofotômetro Varian, modelo Dig Varian Cary (50 NSEL03127475) no comprimento de onda de 480 nm durante 180 segundos, com intervalo de leitura de dez segun-

dos, de acordo com a metodologia descrita por Misra e Fridovich.⁽⁷⁾ A curva resultante desta leitura foi comparada com a curva de oxidação da adrenalina obtida no mesmo dia da análise, sob as mesmas condições da amostra através de uma planilha do Microsoft Excel. O resultado final foi obtido por meio de cálculos baseados em regressões lineares e o valor resultante foi corrigido pelas proteínas totais obtendo-se um resultado expresso em g SOD/g proteína.

A dosagem de proteínas totais foi realizada por meio de kit comercial baseado no método do biureto.

Quantificação de SOD pelo método de redução do WST-1

A quantificação pelo método de redução do WST-1 foi realizada utilizando-se o SOD Assay Kit-WST produzido pela Sigma Aldrich, que é baseado no método nitrozol tetrazólio (NBT). Trata-se de um método indireto, no qual a quantificação se dá por percentual de inibição de SOD por um método colorimétrico com leitura a 440 nm.

As amostras foram preparadas em placas com 96 poços; 20 ul de amostra foram adicionados no poço de amostra e no poço Branco 2. Água duplamente destilada foi adicionada no poço Branco 1 e Branco 3; 200 ul da solução de trabalho WST foram acrescentados em todos os poços. O tampão diluente foi adicionado nos poços Branco 2 e Branco 3 e a solução de trabalho da enzima foi adicionada nos poços contendo amostra e Branco 1. A placa foi incubada a 37°C por vinte minutos para posterior leitura a 450 nm.⁽¹⁴⁾ O resultado foi obtido em atividade de SOD (% de inibição).

Os dados resultantes das análises e os dados clínicos dos pacientes foram armazenados em um banco de dados desenvolvido com o programa Microsoft Office Excel.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SPSS, versão 20.0, utilizando nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão ou frequência. Para a análise estatística foi testada a normalidade das variáveis. As variáveis paramétricas tiveram a relação avaliada pela correlação de Pearson, e as não paramétricas, pela correlação de Spearman. A comparação das médias entre os grupos foi realizada por meio de ANOVA.

Aspectos éticos

Este trabalho está inserido no projeto de pesquisa "Avaliação da relação entre qualidade de vida e estresse oxidativo em pacientes com diabetes melito tipo 2", aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale sob o número de processo 4.03.01.11.1981. Os

participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, ficando uma com o pesquisador e outra com o voluntário. O estudo foi conduzido de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.⁽¹⁵⁾

RESULTADOS

Características gerais da amostra

As características gerais dos voluntários que compõem o perfil da amostra, como sexo, escolaridade e tabagismo, estão descritos na Tabela 1. A maioria dos voluntários foi mulheres (71,4%), com escolaridade de ensino fundamental incompleto, com patologias diversas; entre as mais frequentes estão diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia e depressão.

Tabela 1 - Características gerais dos voluntários

Característica	Frequência (n=63)
Idade (média e desvio padrão)	57,3 (10,7)
Sexo (M)	18 (28,6%)
Escolaridade	
Fundamental incompleto	27 (42,9%)
Fundamental completo	10 (15,9%)
Médio incompleto	6 (9,5%)
Médio completo	8 (12,7%)
Superior incompleto	3 (4,8%)
Superior completo	9 (14,3%)
Patologias	
Hipertensão	29 (46%)
Diabetes	14 (22,2%)
Hipercolesterolemia	13 (20,6%)
Depressão	9 (14,3%)
Artrose	6 (9,5%)
Gastrite	5 (7,9%)
Distúrbios do sono	5 (7,9%)
Glaucoma	2 (3,2%)
Osteopenia	4 (6,3%)
Osteoporose	4 (6,3%)
Problemas na tireoide	3 (4,8%)
Fibromialgia	3 (4,8%)
Artrite reumatoide	3 (4,8%)
Arritmia	2 (3,2%)
Outras *	8 (12,7%)
Tabagismo	
Fumante	5 (7,9%)
Ex-fumante	8 (12,7%)
Não fumante	50 (79,4%)
* Bursite, tendinite, convulsão, dor articular, asma, cardiopatia, transtorno bipolar, osteoartrite	1 (1,6%).

As informações laboratoriais, como perfil lipídico, glicemia, glicohemoglobina e hemograma dos voluntários encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Características laboratoriais dos voluntários

Características laboratoriais	Média e desvio padrão (n=63)
Colesterol (mg/dL)	172 (41)
LDL (mg/ dL)	102 (42)
HDL (mg/ dL)	45 (12)
Triglicerídeos (mg/ dL)	128 (69)
Glicemia (mg/ dL)	95 (25)
Glicohemoglobina (%)	6,2 (1,0)
Eritrócitos (x10 ⁶ /L)	4,6 (0,4)
Hemoglobina (g/ dL)	14,0 (1,2)
Hematócrito (%)	40,3 (3,0)
VCM (fL)	86,7 (4,4)
HCM (pg)	30,2 (1,9)
CHCM (g/ dL)	34,8 (1,0)
RDW (%)	12,6 (1,2)
Leucócitos (/mL)	6.215,2 (2.287,7)
Bastões (%)	0,3 (0,6)
Segmentados (%)	57,6 (8,6)
Eosinófilos (%)	2,9 (2,1)
Basófilos (%)	0,3 (0,5)
Monócitos (%)	6,5 (2,8)
Lintócitos (%)	32,3 (8,2)
Plaquetas (/L)	233.084 (62.900)

Resultados SOD

Foram analisados os níveis de SOD conforme faixa etária. Observa-se, apesar da SOD cair com o passar da idade, que não foram encontradas diferenças estatísticas nestes valores entre as diferentes faixas etárias ($p=0,405$) (Tabela 3). Apesar dos valores de SOD entre homens e mulheres serem diferentes, esta diferença não foi significativa ($p=0,817$). Nos homens, a média de SOD foi de 3,57 (9,7) g SOD/g proteína e, nas mulheres, foi 3,89 (11,5) g SOD/g proteína.

Tabela 3 - Média de SOD de acordo com a idade

Idade (anos)	Média SOD (g SOD/g proteína)	Média SOD WST-1 (% inibição SOD)
< 40 (n=4)	11,91 (18,75)	0,6919 (0,12)
41 - 45 (n=5)	8,59 (17,70)	0,5431 (0,69)
46 - 50 (n=9)	6,01 (11,01)	0,3889 (0,62)
51 - 55 (n=8)	2,35 (4,22)	0,7044 (0,11)
56 - 60 (n=11)	1,96 (1,45)	0,6227 (0,47)
61 - 65 (n=7)	-2,77 (12,09)	0,4265 (0,71)
65 - 70 (n=11)	5,86 (15,60)	0,6617 (0,16)
> 71 (n=7)	0,77 (3,52)	0,7705 (3,89)

Há correlação entre os níveis de SOD e a quantidade de medicamentos utilizada diariamente ($r=0,293$; $p=0,021$). E uma tendência à correlação entre o consumo semana de tomate com os níveis de SOD ($r=0,239$; $p=0,061$).

Na correlação de Pearson, comparando os dois métodos de detecção da SOD, o resultado não foi significativo ($r=0,103$; $p=0,429$).

DISCUSSÃO

Apesar da literatura apontar níveis aumentados de SOD em mulheres em relação aos níveis encontrados em homens, como o estudo de Bolzán, Bianchi e Bianchi⁽¹⁶⁾ e Malling et al.,⁽¹⁷⁾ esta diferença não foi observada no presente estudo. O número reduzido de homens em relação às mulheres entre os voluntários pode ter impedido a observação de alteração significativa nos níveis de SOD entre os dois grupos.

Existe relação entre o nível de estrogênio circulante e as condições antioxidantes, incluindo a produção enzimática. O envelhecimento ovariano ocorre gradualmente, diminuindo os níveis de estrogênio e os níveis das enzimas antioxidantes por consequência.^(18,19) Portanto, a falta de diferença entre os níveis de SOD em homens e mulheres pode ser explicada pela idade da amostra, com mulheres já em menopausa e com diminuição dos níveis de estrogênio.

A produção e atividade da SOD estão ligadas a características genéticas, como aponta estudo realizado com japoneses, que distingue a população em dois grupos: um com baixos níveis plasmáticos de SOD (aproximadamente 94%) e outro com níveis elevados (6%). Outro estudo semelhante, agora com suecos, demonstra que mutações na ligação da enzima com a heparina podem resultar em aumento dos níveis plasmáticos da EC-SOD, apesar das consequências dessa mutação ainda não estarem esclarecidas.⁽³⁾

Há uma tendência à diminuição da atividade da EC-SOD a partir dos 28 anos de idade, devido à inativação enzimática pelo peróxido de hidrogênio.⁽¹⁶⁾ A amostra foi composta por voluntários com idade média de 57,3^(7,10) anos, sendo todos acima de 35 anos. Portanto, a falta de correlação entre idade e SOD encontrada neste estudo pode ser explicada pela idade dos voluntários, uma vez que o período de mudanças nas concentrações da enzima já teria iniciado.

Os voluntários participantes deste estudo são, em sua maioria, portadores de alguma patologia; algumas delas têm relação direta com o estresse oxidativo ou a produção e atividade da SOD. Entre elas, a diabetes melito tipo 2 e a hipercolesterolemia (como precursora da aterosclerose). Isso causa alterações nos níveis de EC-SOD detectados, podendo levar à falta de correlação com alguns parâmetros, como idade e sexo.^(20,3)

Níveis elevados de EC-SOD estão relacionados com fatores de risco cardiovascular, síndrome coronariana aguda, hipertensão, diabetes melito, lesões isquêmicas, doenças pulmonares, doenças neurológicas e inflamatórias.⁽²¹⁾

Entretanto, o comportamento da SOD frente à diabetes melito tipo 2 não está completamente esclarecido, uma vez que tanto o aumento como a diminuição da atividade enzimática são relatados. Sabe-se que a patologia da doença, no que se refere à resistência à insulina e intolerância à glicose, responsáveis pelo desenvolvimento da diabetes melito tipo 2, são mediadas pelo estresse oxidativo; bem como as complicações vasculares e ateroscleróticas associadas ao avanço da doença. Os níveis de EC-SOD também estão relacionados com o índice de massa corporal e índice de avaliação de resistência à insulina.^(20,22,23)

Em estudo realizado com pacientes diabéticos, Bandeira et al.⁽²⁰⁾ encontraram valores de SOD aumentados principalmente em pacientes com alta peroxidação lipídica. O aumento de SOD na presença do dano oxidativo pode ser explicado como uma resposta adaptativa do organismo contra o estresse oxidativo. Todavia, Ghattas e Abo-Emalty⁽²²⁾ encontraram níveis de SOD diminuídos para pacientes com diabetes melito tipo 2, o que pode ser consequência do nível elevado de peróxido de hidrogênio.

O tabagismo está associado a baixos níveis de SOD.⁽²⁴⁾ Por ser um grande formador de radicais livres, o álcool também está associado ao estresse oxidativo e alterações nos níveis das enzimas antioxidantes.⁽²⁵⁾

O estresse oxidativo implica na patogênese da aterosclerose e alguns antioxidantes têm demonstrado inibir o processo de aterogênese. Alguns estudos indicam o aumento na produção de superóxido em vasos ateroscleróticos, podendo interferir no tônus vascular. Por outro lado, a expressão de EC-SOD é reduzida em pacientes com doença arterial coronariana, contribuindo com a disfunção endotelial nestes pacientes. Já em indivíduos hipercolesterêmicos, a atividade da EC-SOD é aumentada, em uma possível tentativa do organismo em combater a disfunção endotelial. Essa superexpressão de SOD pode proteger contra a oxidação do LDL, grande contribuidor da formação da placa aterosclerótica.⁽³⁾

Alguns fatores relacionados a medicamentos, principalmente à sua toxicidade, incluem a formação de metabólitos reativos, capazes de se ligarem covalentemente a proteínas e à geração do estresse oxidativo. Estes fatores podem ser aumentados pelo consumo concomitante de dois ou mais medicamentos.⁽²⁶⁾ A relação existente entre a quantidade diária de medicamentos e os níveis de SOD observada neste estudo pode ser explicada pela produção de superóxido durante a metabolização destas substâncias, tendo a produção da SOD como resposta adaptativa do organismo.

O tomate é um dos principais alimentos antioxidantes,⁽²⁷⁾ todavia não existem relatos na literatura de qualquer relação do consumo de tomate com os níveis plasmáticos da EC-SOD.

O método da adrenalina nos fornece resultados em g SOD/g proteína, enquanto que o método do WST-1 o faz por percentual de inibição da SOD, quantificando a atividade enzimática. Esta pode ter sido a principal causa da não correlação entre os métodos apresentada neste estudo.^(7,14)

Outras diferenças podem ter contribuído para a falta de correlação entre os resultados. Enquanto o método da adrenalina utiliza o adrenocromo para a quantificação de SOD, o método comercializado pela Sigma Aldrich (R) utiliza a formação do corante formazan, usando o WST-1 como componente cromóforo. Outro fator contribuinte é o fato do método de inibição da auto-oxidação da adrenalina necessitar acompanhamento constante de temperatura (32°C) e pH do tampão,^(2,10) e quaisquer intercorrências nessas medidas podem prejudicar a execução da análise.^(7,10,14)

Outros estudos de comparação de métodos para a quantificação de SOD já foram realizados, como o de Zhou e Prognon,⁽¹⁰⁾ que testaram dois métodos enzimáticos para a determinação de SOD em matérias primas: o método referência NBT e o método WST-1. Seus resultados demonstraram que a qualidade dos resultados depende de pequenas variações nas condições experimentais. Os resultados extremamente semelhantes entre os métodos devem-se, principalmente, ao fato de ambos serem baseados no mesmo princípio.

CONCLUSÕES

Os níveis de EC-SOD sofrem influências genéticas e do meio, como consumo de medicamentos e alimentos antioxidantes. Para determinar a relação entre sexo, idade e SOD seriam necessários novos estudos, com maior número amostral. Não há correlação entre os métodos avaliados.

Desta forma, são necessários mais estudos populacionais que permitam traçar o perfil de SOD da população. Para isso, é interessante que se relacione a SOD com marcadores de peroxidação lipídica, como o MDA, e se obtenham as características genéticas para que, posteriormente, possa-se traçar o perfil de SOD para as diversas patologias a ela associadas.

Estudos no campo do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes são extremamente necessários principalmente por causa do papel desempenhado pelo estresse oxidativo no avanço e patologia de inúmeras doenças. Neste estudo, não foi encontrada nenhuma correlação entre a atividade de SOD e fatores como idade ou sexo, porém é necessário que os níveis enzimáticos estejam bem esclarecidos.

Abstract

Objective: This study aim is evaluate EC-SOD levels by epinephrine auto oxidation method of volunteers and correlate it with clinical condition, as well as compare with WST-1 method results. **Methods:** It was assessment 63 volunteers SOD levels with inhibition of epinephrine oxidation method and the WST-1 reduction method. **Results:** There was no correlation between SOD levels and volunteer's age or sex, but the SOD levels was higher on volunteers that was using more medicines per day. **Conclusion:** There was no correlation between the two measurement SOD methods.

Keywords

Oxidative stress; Epinephrine; Superoxide dismutase

REFERÊNCIAS

- Acharya JD, Ghaskadbi SS. Islets and their antioxidant defense. *Islets*. 2010 Jul-Aug;2(4):225-35.
- Rosanna DP, Salvatore C. Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. *Curr Pharm Des*. 2012;18(26):3889-900.
- Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*. 2003 Aug 1;35(3):236-56.
- Bafana A1, Dutt S, Kumar S, Ahuja PS. Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Crit Rev Biotechnol*. 2011 Mar;31(1):65-76
- Gottfredsen RH, Larsen UG, Enghild JJ, Petersen SV. Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. *Redox Biol*. 2013 Jan 11;1:24-31.
- Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Molecules in focus: Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Dec;37(12):2466-71.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170-5.
- Dries SS. Estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 em tratamento com metformina (TCC). Curso de Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 2011. Disponível em: <http://ebooks.pucrs.br/edipucrs/anais/seminarioic/20112/4/3/2/2.pdf>
- Soares BS. Influência do tratamento farmacológica com metformina e glibenclâmidia sobre o estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. (TCC) Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 2012.
- Zhou JY, Prognon P. Raw material enzymatic activity determination: a specific case for validation and comparison of analytical methods—the example of superoxide dismutase (SOD). *J Pharm Biomed Anal*. 2006 Mar 18;40(5):1143-8.
- Wagner BA, Witmer JR, van 't Erve TJ, Buettner GR. An assay for the rate of removal of extracellular hydrogen peroxide by cells. *Redox Biol*. 2013;1(1):210-7.
- Bhatia S, Shukla R, Venkata Madhu S, Kaur Gambhir J, Madhava Prabhu K. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide and products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem*. 2003 Oct;36(7):557-62.
- Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013 Oct 1;46:200-6.
- Sigma Aldrich. 19160 SOD determination kit. Suíça, outubro, 2004.
- Brasil, Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos. 1996.
- Bolzán AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clin Biochem*. 1997 Aug;30(6):449-54.

17. Malling TH, Sigsgaard T, Andersen HR, Deguchi Y, Brandslund I, Skadhauge L, et al. Differences in association between markers of antioxidative defense and asthma are sex specific. *Gend Med*. 2010 Apr;7(2):115-24
18. Bellanti F, Matteo M, Rollo T, De Rosario F, Greco P, Vendemiale G, et al. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol*. 2013 Jun 19;1:340-6.
19. Pejić SA, Kasapović JD, Todorović AU, Stojiljković VR, Gavrilović LV, Popović NM, et al. Antioxidant enzymes in women with endometrial polyps: relation with sex hormones. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Sep;170(1):241-6.
20. Bandeira Sde M, Guedes Gda S, da Fonseca LJ, Pires AS, Gelain DP, Moreira JC, et al. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:819310.
21. Grammer TB, Renner W, Hoffmann MM, Kleber M, Winkelhofer-Roob BM, et al. SOD 2 R231G polymorphism associated with coronary artery disease and myocardial infarction. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Free Radic Res*. 2009 Jul;43(7):677-84.
22. Ghattas MH, Abo-Elmatty DM. Association of polymorphic markers of the catalase and superoxide dismutase genes with type 2 diabetes mellitus. *DNA Cell Biol*. 2012 Nov;31(11):1598-603.
23. Kamiya T1, Hara H, Inagaki N, Adachi T. The effect of hypoxia mimetic cobalto chloride on the expression of EC-SOD in 3T3-L1 adipocytes. *Redox Rep*. 2010;15(3):131-7.
24. Naga Sirisha CV, Manohar RM. Study of antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase level in tobacco chewers and smoker: a pilot study. *J Cancer Res Ther*. 2013 Apr-Jun;9(2):210-4.
25. Yao P, Li K, Jin Y, Song F, Zhou S, Sun X, Nüssler A, Liu L. Oxidative damage after chronic ethanol intake in rat tissues: prophylaxis of Ginkgo biloba extract. *Food Chemistry*. 2006;99:305-14.
26. Ramm S, Mally A. Role of drug-independent stress factors in liver injury associated with diclofenac intake. *Toxicology*. 2013 Oct 4;312:83-96 . Erratum in *Toxicology*. 2014 Feb 28;316:71-4.
27. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr., maio/ago*. 1999;12(2):123-30.

Correspondência

Fernanda Dapper Machado

ERS-239, 2755

93352-000 – Novo Hamburgo, RS, Brasil