

ARTIGO ORIGINAL

## Avaliação do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes na patogénese da doença pulmonar obstrutiva crónica<sup>☆</sup>

C. Cristóvão<sup>a,\*</sup>, L. Cristóvão<sup>b,c,d,e</sup>, F. Nogueira<sup>a</sup> e M. Bicho<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, Hospital de Egas Moniz, Lisboa, Portugal

<sup>b</sup> Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>c</sup> Faculdade de Ciências Biomédicas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>d</sup> Unidade de Biotecnologia Ambiental, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>e</sup> Laboratório de Genética, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Recebido a 20 de fevereiro de 2012; aceite a 14 de setembro de 2012

Disponível na Internet a 29 de novembro de 2012

### PALAVRAS-CHAVE

Doença pulmonar obstrutiva crónica;  
Stress oxidativo;  
Peroxidação lipídica;  
Antioxidantes

**Resumo** A doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) é uma das doenças crónicas mais comuns e representa uma importante causa de morbilidade e mortalidade. Um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (*stress oxidativo*) tem sido proposto como um acontecimento importante na patogénese da DPOC. O aumento do *stress oxidativo* em doentes com DPOC é o resultado da presença de oxidantes exógenos, nomeadamente, poluentes e fumo do tabaco, assim como oxidantes endógenos produzidos durante a inflamação. O objetivo do presente estudo consistiu em clarificar a hipótese sobre a existência de um desequilíbrio entre oxidantes e as defesas antioxidantes associado à DPOC. Neste estudo, avaliou-se um biomarcador do *stress oxidativo* (malonildialdeído, um produto resultante da peroxidação lipídica) e antioxidantes não-enzimáticos (vitamina C e grupos sulfidrilo), em doentes com DPOC e em controlos saudáveis. Observou-se um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) do marcador do *stress oxidativo* nos doentes com DPOC comparativamente ao grupo controlo. Não foram encontradas alterações dependentes da idade nos níveis dos produtos da peroxidação lipídica. Os doentes DPOC apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do *status* antioxidante, comparativamente ao grupo controlo. Os nossos resultados evidenciam que o *stress oxidativo* representa uma importante alteração fisiopatológica na DPOC.

© 2012 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.

<sup>☆</sup> Trabalho realizado no laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e nos laboratórios da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias de Lisboa.

\* Autor para correspondência.

Correio eletrónico: [cristina.cristovao@iol.pt](mailto:cristina.cristovao@iol.pt) (C. Cristóvão).

**KEYWORDS**

Chronic obstructive pulmonary disease;  
Oxidative stress;  
Lipid peroxidation;  
Antioxidants

**Evaluation of the oxidant and antioxidant balance in the pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**

**Abstract** Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is one of the most common chronic diseases and a major cause of morbidity and mortality. An imbalance between oxidants and antioxidants (oxidative stress) has been proposed as a critical event in the pathogenesis of COPD. The increased oxidative stress in patients with COPD is the result of exogenous oxidants namely pollutants and cigarette smoke as well as endogenous oxidant production during inflammation. The aim of the present study was to clarify the hypothesis about the presence of an imbalance between oxidants and the antioxidant defences associated to COPD. In this study, we evaluated a biomarker of oxidative stress (malondialdehyde, a lipid peroxidation derived product) and non-enzymatic antioxidants (vitamin C and the sulphhydryl groups) in COPD patients and healthy controls. The marker of oxidative stress was found to be significantly ( $p < 0,001$ ) higher in COPD patients when compared with the control group. No age dependent changes in the plasma levels of lipid peroxidation products were found. COPD patients had a significant ( $p < 0,001$ ) decrease in antioxidant *status* compared with control group. Our results show that oxidative stress is an important pathophysiologic change in COPD.

© 2012 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introdução**

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma das doenças crônicas mais comuns e representa uma importante causa de morbidade e mortalidade<sup>1-3</sup>. Têm surgido evidências experimentais sobre um desequilíbrio entre oxidantes/antioxidantes, a favor das espécies reativas oxidantes (*stress oxidativo*), associado à DPOC<sup>2,4-8</sup>. O envolvimento do *stress oxidativo* na patogênese da DPOC parece ser determinante para a manifestação da resposta inflamatória do pulmão<sup>9-13</sup>. O aumento do *stress oxidativo* em doentes com DPOC resulta da ação de oxidantes exógenos (tais como os poluentes atmosféricos e componentes do tabaco), assim como oxidantes endógenos, produzidos durante o processo inflamatório. Contudo, existem numerosos resultados inconsistentes em estudos sobre desequilíbrio oxidante e antioxidante associado à patogênese da DPOC<sup>14,15</sup>. Um dos principais alvos do *stress oxidativo* são os ácidos gordos polinsaturados presentes nas membranas celulares<sup>16,17</sup>. As espécies oxidantes conduzem a um processo de várias etapas que, na sua globalidade, é classificado como peroxidação lipídica. Existem vários produtos resultantes da peroxidação lipídica, sendo de considerar entre eles um dialdeído (malondialdeído [MDA]) com reconhecida ação lesiva a nível do genoma humano, sendo considerado um potencial agente genotóxico e clastogénico<sup>18</sup>. Neste sentido, a avaliação do MDA em amostras biológicas é considerada um indicador do aumento da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, da lesão oxidativa *in vivo*<sup>16,19,20</sup>.

Existe evidência de que o *stress oxidativo* se manifesta em circulação por uma falência da capacidade antioxidante plasmática (vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -caroteno e sulfidrilos) associada aos hábitos tabágicos. De modo semelhante, ocorre uma falência na capacidade antioxidante plasmática nas exacerbações da DPOC<sup>5,13</sup>. Estudos epidemiológicos demonstraram uma relação entre o aumento da ingestão de vitaminas antioxidantes C e E com a diminuição da prevalência de bronquite crônica em fumadores<sup>21</sup>.

O principal objetivo deste estudo consistiu em clarificar a hipótese formulada sobre a existência de um desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a defesa antioxidante, associado à patogênese da DPOC.

**Material e métodos****População em estudo**

Foram estudados 20 doentes (média da idade  $71,30 \pm 7,68$  anos) com DPOC estável (sem história de exacerbações há mais de 6 meses): 15 com história tabágica e 5 não-fumadores, com exposição tabágica passiva ou exposição ocupacional. As características clínicas e fisiológicas do grupo DPOC estão apresentadas na [tabela 1](#). Nos ex-fumadores, a cessação tabágica ocorreu pelo menos um ano antes da sua participação neste estudo. Foi estudado como controlo um grupo de 50 indivíduos saudáveis (média da idade  $41,60 \pm 12,31$  anos; 12 do sexo feminino, 38 do sexo masculino e índice de massa corporal, IMC

**Tabela 1** Características clínicas e fisiológicas dos doentes DPOC

Parâmetros clínicos e fisiológicos	Valores
Idade, anos	$71,30 \pm 7,68$
Sexo masculino/feminino, n	11/9
Índice de massa corporal, kg/m <sup>2</sup>	$27,918 \pm 1,724$
Hábitos tabágicos: ex-fumadores/não fumadores, n	15/5
N.º unidades maço/ano nos ex-fumadores	$68,8 \pm 10,754$
Estadio GOLD: I/II/IV, n	2/4/14
FVC, % do previsto	$77,100 \pm 5,190$
FEV <sub>1</sub> , % do previsto	$58,130 \pm 5,332$
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	$59,453 \pm 3,805$
paO <sub>2</sub> , mmHg	$66,700 \pm 2,71$

27,322 ± 4,310 kg/m<sup>2</sup>) sem antecedentes de doença pulmonar. Doze destes indivíduos eram fumadores e 38 não fumadores.

O *stress* oxidativo foi avaliado no plasma através da determinação dos níveis do biomarcador MDA em doentes com DPOC e no grupo controlo. O *status* antioxidante foi avaliado pela quantificação da vitamina C e dos grupos sulfidrílo (-SH) totais, através de métodos espectrofotométricos.

O estudo foi realizado de acordo com as normas da declaração de Helsínquia. O consentimento informado foi obtido para todos os indivíduos que participaram neste estudo.

## Métodos

### Determinação do malonildialdeído plasmático

O biomarcador sistémico do *stress* oxidativo foi avaliado no plasma através da quantificação dos níveis de um produto resultante da peroxidação lipídica, o MDA. As concentrações de MDA foram determinadas espectrofotometricamente em termos das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando o método modificado a partir de Okhawa et al.<sup>22</sup> Foram lidas as absorvências a 532 nm correspondentes ao complexo corado formado entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA). A concentração das TBARS foi calculada através das concentrações de MDA e usando uma curva de calibração previamente elaborada. As concentrações de MDA são expressas em nmol/mL de plasma.

### Quantificação da vitamina C

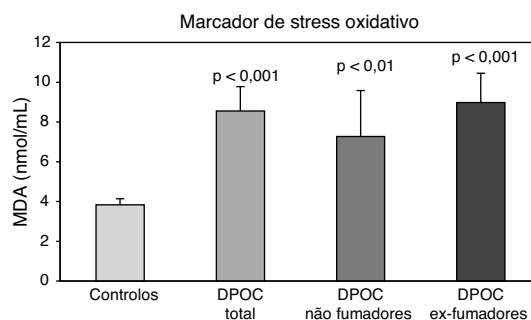
Os níveis de vitamina C foram monitorizados através do método descrito por Omaye et al.<sup>23</sup> Resumidamente, a dinitrofenilhidrazina reage com o estado oxidado da vitamina C (ácido ascórbico oxidado) com formação de um produto corado. As absorvências lidas a 520 nm são diretamente proporcionais à concentração de vitamina C. Os níveis de vitamina C são expressos em µg/mL de plasma.

### Determinação dos grupos sulfidrílo não proteicos

Os grupos sulfidrílo não proteicos existem maioritariamente sob a forma do glutatíon reduzido (GSH). Avaliámos os grupos sulfidrílo aplicando o método espectrofotométrico envolvendo a utilização do reagente de Ellman<sup>24</sup>. O ácido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) sofre uma modificação química na presença de grupos sulfidrílo, ocorrendo a formação do anião 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). A absorvência deste produto corado lida a 412 nm é diretamente proporcional à concentração de GSH. Os níveis de grupos sulfidrílo são expressos em µmol/mL de plasma.

### Análise estatística

Os resultados das concentrações dos parâmetros plasmáticos avaliados são expressos em valores médios ± SEM. Foi aplicado teste estatístico não paramétrico sempre que os resultados não apresentaram uma distribuição normal. Para a comparação entre os dois grupos estudados foram usados o teste t não emparelhado ou o teste de Mann-Whitney. Foram



**Figura 1** Níveis de malonildialdeído (MDA) plasmático dos controlos e dos doentes DPOC. Valores expressos em média ± SEM. Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre controlos e total de doentes DPOC. Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre controlos e doentes não fumadores. Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre controlos e doentes ex-fumadores. Diferença não significativa entre doentes DPOC não fumadores e ex-fumadores.

consideradas estatisticamente significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## Resultados

### *Stress* oxidativo e *status* antioxidante

As concentrações plasmáticas de MDA, vitamina C e grupos sulfidrílo dos doentes com DPOC (total doentes, doentes não fumadores e ex-fumadores) e do grupo controlo são apresentados na *tabela 2*. Observou-se um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) do marcador do *stress* oxidativo (TBARS avaliados pelo MDA produzido) nos doentes DPOC comparativamente ao grupo controlo. A *figura 1* apresenta os níveis de MDA plasmático nos controlos e nos doentes DPOC. Não se encontraram diferenças significativas nos níveis de MDA associados à idade. Adicionalmente, observou-se uma diferença significativa entre controlos e doentes DPOC não fumadores ( $p < 0,01$ ) e ex-fumadores ( $p < 0,001$ ). Os nossos resultados mostraram não haver diferença significativa nos TBARS dos doentes DPOC ex-fumadores em comparação com os doentes DPOC não fumadores. Contudo, observou-se um aumento do marcador do *stress* oxidativo associado aos doentes ex-fumadores.

Os doentes DPOC apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) no *status* antioxidante (vitamina C e grupos sulfidrílo) comparativamente ao grupo controlo (*fig. 2*). Não foi observada diferença significativa entre doentes DPOC não fumadores e ex-fumadores. No entanto, verificou-se uma diminuição da vitamina C associada aos doentes ex-fumadores.

### Discussão e conclusões

Os oxidantes promovem a peroxidação lipídica na membrana celular. A deteção de um produto da peroxidação lipídica no plasma, nomeadamente o MDA, é uma ferramenta útil para demonstrar a ocorrência de *stress* oxidativo *in vivo*. O objetivo do presente estudo consistiu na comparação entre um grupo de doentes com DPOC e um grupo

**Tabela 2** Níveis de MDA plasmático e *status* antioxidante dos grupos estudados

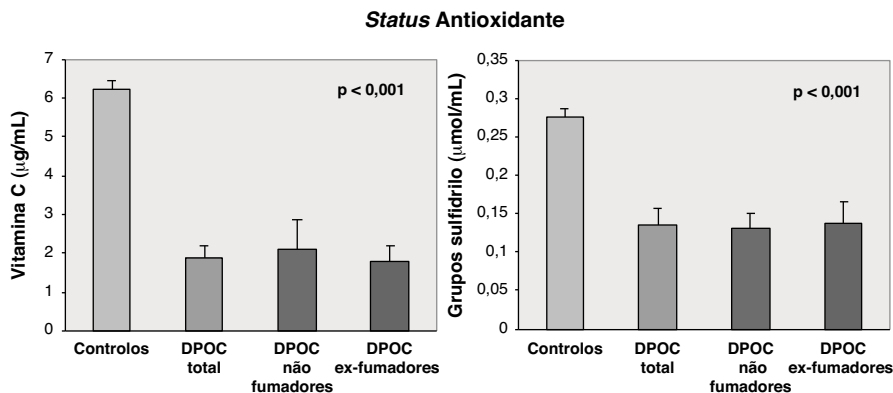
	Controlos (n = 50)	DPOC total (n = 20)	DPOC não fumadores (n = 5)	DPOC ex-fumadores (n = 15)
MDA (nmol/mL)	3,830 ± 0,310	8,549 ± 1,228	7,268 ± 2,309	8,976 ± 1,472
Vitamina C (µg/mL)	6,230 ± 0,220	1,866 ± 0,353	2,119 ± 0,770	1,782 ± 0,408
Grupos sulfidrilo (µmol/mL)	0,275 ± 0,011	0,135 ± 0,022	0,130 ± 0,021	0,137 ± 0,029

Valores expressos em média ± SEM.

controle, relativamente à produção de MDA e aos níveis de antioxidantes, vitamina C e grupos tiol. Os nossos resultados demonstraram que o *stress* oxidativo é uma importante alteração fisiopatológica na DPOC. O aumento dos produtos da peroxidação lipídica no plasma dos doentes com DPOC suporta a hipótese do *stress* oxidativo associado à doença. De acordo com os nossos resultados, o aumento do *stress* oxidativo é mais evidente nos doentes com hábitos tabágicos, apesar de não termos encontrado diferenças significativas quer na peroxidação lipídica quer no *status* antioxidante em doentes não fumadores e ex-fumadores. Paralelamente, não observámos diferença significativa no marcador do *stress* oxidativo e no *status* antioxidante entre saudáveis fumadores e não-fumadores. Rahman et al.<sup>25</sup> observaram a formação de um produto da peroxidação lipídica em células do epitélio respiratório, células endoteliais, neutrófilos e macrófagos de fumadores com e sem DPOC. Estes autores concluíram que o *stress* oxidativo resultante do fumo do tabaco parece ser mais pronunciado nos indivíduos que desenvolveram DPOC. Estudos prévios apresentados por outros autores demonstraram não existir correlação entre os níveis de TBARS e de peróxido de hidrogénio na DPOC associada a hábitos tabágicos<sup>26</sup>. No entanto, e apesar de os nossos resultados serem preliminares, eles permitiram observar uma tendência para um aumento dos níveis de MDA associado a doentes DPOC com hábitos tabágicos.

Os antioxidantes são igualmente considerados como marcadores do *stress* oxidativo. Define-se como antioxidante qualquer substância que, quando presente mesmo a baixas concentrações, comparativamente ao substrato que se oxida, retarda ou inibe consideravelmente a oxidação do mesmo<sup>16</sup>. Os antioxidantes podem atuar em diferentes estadios da sequência oxidativa. O plasma contém uma

diversidade de antioxidantes, nomeadamente a vitamina C e os grupos tiol. A diminuição dos antioxidantes plasmáticos poderá indicar a progressão biológica do *stress* oxidativo. Quando ocorre aumento de oxidantes e diminuição da defesa antioxidante, origina-se uma situação de *stress* oxidativo conducente a uma excessiva lesão a nível celular e tecidual<sup>16</sup>. Apesar de algumas limitações, a vitamina C plasmática tem sido considerada como um índice para a avaliação bioquímica do *status* desta vitamina<sup>23</sup>. A vitamina C plasmática é particularmente importante na diminuição da peroxidação lipídica no plasma induzida pela fase gasosa do fumo do tabaco *in vitro*<sup>27</sup>. Adicionalmente, foi sugerido o efeito protetor dos antioxidantes alimentares, tais como as vitaminas A, C e E, relativamente ao *stress* oxidativo na patogênese do enfisema em fumadores<sup>3</sup>. Paralelamente, outros estudos demonstraram o decréscimo da capacidade antioxidante em doentes com DPOC quando comparados com o controlo<sup>28-30</sup>. Contudo, existe uma divergência relativamente a outros estudos sobre a relação entre o *status* antioxidante e a função pulmonar em doentes com DPOC<sup>14</sup>. Isto devido ao facto de outros estudos não terem encontrado efeito protetor dos antioxidantes na função pulmonar<sup>30</sup>. Os mecanismos moleculares envolvendo a defesa antioxidante na DPOC permanecem ainda por esclarecer<sup>31,32</sup>. Neste estudo, verificou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) no *status* antioxidante (vitamina C e grupos sulfidrilo) nos doentes com DPOC quando comparado com o grupo controlo. Esta diminuição significativa da vitamina C e dos grupos sulfidrilo associada aos doentes com DPOC é concordante com a hipótese que relaciona o glutatíon, considerado o sulfidrilo não proteico celular mais abundante, e o ciclo redox do glutatíon, como um possível mecanismo antioxidante envolvido na proteção contra o *stress* oxidativo<sup>33</sup>. Os nossos



**Figura 2** Concentração plasmática de vitamina C e grupos sulfidrilo nos controlos e doentes DPOC. Valores expressos em média ± SEM. Doentes DPOC apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) no *status* antioxidante (vitamina C e grupos -SH) comparativamente ao grupo controlo.

resultados não apontam para uma diferença significativa no *status* antioxidante entre não fumadores e fumadores saudáveis nem entre não fumadores e ex-fumadores doentes. Contudo, observou-se uma tendência para a diminuição da vitamina C associada aos doentes DPOC com hábitos tabágicos.

Neste estudo, a diferença de idades entre os controlos e os doentes com DPOC pode ser considerada uma limitação. Com o intuito de observarmos o efeito da idade, comparámos os resultados dos indivíduos saudáveis com idade inferior e superior ou igual a 50 anos. Não foram observadas diferenças significativas no MDA plasmático e no *status* antioxidante associadas à idade. Este dado é apoiado por estudos de outros autores, pelo facto de não terem encontrado relação entre a capacidade antioxidante plasmática e sulfidrilo e a idade em indivíduos saudáveis<sup>21,28</sup>. Outros estudos demonstraram que não existe alteração dos níveis plasmáticos de MDA com a idade, na população em geral<sup>34,35</sup>. Simultaneamente, outros autores verificaram uma redução acentuada do MDA associada à patologia respiratória crónica, particularmente na DPOC.

Tem sido sugerido que o aumento dos níveis de MDA relacionado com a fisiopatologia da DPOC possa ser considerado um marcador promissor do *stress* oxidativo nas doenças pulmonares crónicas<sup>17</sup>.

No nosso estudo não foi analisado o efeito da oxigenoterapia. Contudo, o efeito desta terapêutica no *stress* oxidativo nos doentes com DPOC mantém-se controverso. Os nossos resultados evidenciaram uma diferença significativa no *stress* oxidativo e no *status* antioxidante entre controlos e doentes com DPOC, independente da oxigenoterapia. Não foram encontradas diferenças significativas associadas à oxigenoterapia. Mais estudos serão necessários de modo a clarificar os efeitos da oxigenoterapia nos doentes com DPOC.

Em conclusão, este estudo demonstrou que os níveis elevados de TBARS, nomeadamente um dos produtos finais do *stress* oxidativo, são mais pronunciados nos doentes com DPOC. Concomitantemente, foi observada uma diminuição significativa na proteção antioxidante associada à DPOC, quer em doentes não fumadores quer em ex-fumadores. O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes poderá ser um evento importante associado à DPOC. Estes dados poderão ter implicações terapêuticas no futuro.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Professor J. Mexia, que muito contribuiu para a Análise Estatística deste trabalho. Estendemos o nosso agradecimento aos doentes DPOC e aos voluntários saudáveis que generosamente colaboraram neste estudo.

## Bibliografia

1. Repine JE, Bast A, Lankhorst I, Oxidative Stress Study Group. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:341–57.
2. Tuder RM, Voelkel NF. The pathobiology of chronic bronchitis and emphysema. In: Voelkel NF, MacNee W, editores *Chronic Obstructive Lung Diseases*. BC Decker Inc; 2002. p. 90–113.
3. Vestbo J. Epidemiology. In: Voelkel NF, MacNee W, editores *Chronic Obstructive Lung Diseases*. BC Decker Inc; 2002. p. 41–55.
4. Rahman I, MacNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1996;51:348–50.
5. MacNee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:558–65.
6. MacNee W. Oxidants/Antioxidants and COPD. *CHEST.* 2000;117:3035–175.
7. Hanta I, Kocabas A, Canacankatan N, Kuleci S, Seydaoglu G. Oxidant-antioxidant balance in patients with COPD. *Lung.* 2006;184:51–5.
8. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology.* 2009;14:27–38.
9. Langen RCJ, Korn SH, Wouters EFM. ROS in the local and systemic pathogenesis of COPD. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:226–35.
10. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2:258–66.
11. Dourado VZ, Tanni SE, Vale SA, Faganello MM, Sanchez FF, Godoy I. Systemic manifestations in chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol.* 2006;32:161–71.
12. Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2011;6:413–21.
13. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2:50–60.
14. Kluchová Z, Petrásova D, Joppa P, Dorková Z, Tkáčová R. The association between oxidative stress and obstructive lung impairment in patients with COPD. *Phys Res.* 2007;56:51–6.
15. Mak JCW. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:368–74.
16. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41:1819–28.
17. Bartoli ML, Novelli F, Costa F, Malagrino L, Melosini L, Bacci E, et al. Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators Inflamm.* 2011;1–6.
18. Rueff J, Laires A, Brás A, Borba H, Chaveca T, Gaspar J, et al. DNA damage and oxygen species. Em: *DNA repair mechanisms and their biological implications in mammalian cells*. New York: Plenum Press; 1989. p. 171–81.
19. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesselin G, Wouters EFM. Systemic effects of smoking. *Chest.* 2007;131:1557–66.
20. Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Rad Bol Med.* 2009;47:1371–4.
21. Rahman I, Swarska E, Henry M, Stolk J, MacNee W. Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax.* 2000;55:189–93.
22. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351–8.
23. Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE. Selected methods for determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. In: McCormick DB, Wrigth LD, editores *Methods Enzymol, Vitamins and Coenzymes*. New York: Academic Press; 1979. p. 3–11.
24. Rice-Evans C, Diplock A, Symons C. Techniques in Free Radical Research. In: Burdon RH, Knippenberg PH, editores *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier; 1991. p. 227–9.

25. Rahman I, van Schadewijk AAM, Crowther AJL, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:490-5.
26. Nowak D, Kasielski M, Antczak A, Pietras T, Bialasiewicz P. Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir Med.* 1999;93:389-96.
27. Cross CE, O'Neill CA, Reznick AZ, Hu ML, Marcocci L, Packer L, et al. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;686:72-90.
28. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:1055-60.
29. Agacdiken A, Basyigit I, Özden M, Yıldız F, Ural D, Maral H, et al. The effects of antioxidants on exercise-induced lipid peroxidation in patients with COPD. *Respirology.* 2004;9:38-42.
30. Nadeem A, Raj HG, Chhabra SK. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation.* 2005;29:23-32.
31. Foronjy R, Wallace A, d'Armiento J. The pharmacokinetic limitations of antioxidant treatment for COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21:370-9.
32. Rahman I. Antioxidant therapeutic advances in COPD. *Ther Adv Respir Dis.* 2008;2:351-74.
33. Gould NS, Min E, Gauthier S, Chu HW, Martin R, Day BJ. Aging adversely affects the cigarette smoke-induced glutathione adaptive response in the lung. *Am J Resp Crit Care Med.* 2010;182:1114-22.
34. Bridges AB, Scott NA, Parry GJ, Belch JJ. Age, sex, cigarette smoking and indices of free radical activity in healthy humans. *Eur J Med.* 1993;2:205-8.
35. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol.* 2002;156:274-85.