

Patrícia de Sousa Pais

Efeitos de Fármacos em Sistemas Biológicos: Stress Oxidativo e Metabolismo
Antioxidante

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2012

Efeitos de Fármacos em Sistemas Biológicos: Stress Oxidativo e Metabolismo Antioxidante

Patrícia de Sousa Pais

Efeitos de Fármacos em Sistemas Biológicos: Stress Oxidativo e Metabolismo
Antioxidante

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2012

Patrícia de Sousa Pais

Efeitos de Fármacos em Sistemas Biológicos: Stress Oxidativo e Metabolismo
Antioxidante

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

I. Sumário

Os efeitos de várias substâncias, sejam elas fármacos ou não, vão sendo acumulados durante toda a vida de um organismo. Alguns desses efeitos podem ser mais pronunciados relativamente a outros, pelo que vão desencadear respostas mais acentuadas e marcadas. Ao longo deste trabalho, foram estudados os efeitos que alguns fármacos poderão exercer em sistemas biológicos, nomeadamente ao nível do stress oxidativo, incluindo a indução de alterações deletérias em lípidos, proteínas e DNA; paralelamente, fez-se uma análise da resposta biológica em relação à presença de agentes oxidantes, que envolve o metabolismo antioxidante. Entende-se por stress oxidativo, uma situação em que ocorre um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de compostos oxidantes, que contribui para a geração de radicais livres. Contudo, existem mecanismos de defesa, que tanto podem ser enzimáticos, (ex.: certas enzimas, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase), como podem ser não enzimáticos (incluem-se nesta categoria certas vitaminas, como a vitamina A, vitamina E, flavonóides e flavonas).

II. Abstract

The effects from multiple substances, either drugs or not, accumulate during an organism life time. Some of these effects may have a deeper impact than others, triggering sharper and more intense responses. Throughout this dissertation project, the effects that some drugs have on biological systems we be studied, namely at the level of oxidative stress, including inducing deleterious changes in lipids, proteins and DNA. At the same time, an analysis was made about the biological response concerning the presence of oxidizing agents, which involves the metabolism antioxidant. Oxidative stress refers to a situation where an imbalance occurs between the antioxidant defense system and production of oxidizing compounds, which contributes to the generation of free radicals. However, there are defense mechanisms, which can be either enzymatic (certain enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and catalase), as can be non-enzymatic (including on this category certain vitamins, such as vitamin A, vitamin E, flavonoids and flavones).

Palavras-chave – Stress oxidativo, metabolismo antioxidante, espécies reativas ao oxigénio, espécies reativas ao azoto, classes farmacológicas, espécies-alvo.

III. Dedicatórias

Gostaria de dedicar este projeto de dissertação a todos aqueles que, de forma incondicional, sempre me apoiaram ao longo de todo o meu percurso acadêmico.

IV. Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles, que direta ou indiretamente contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho:

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Prof. Doutor Bruno Nunes por toda a disponibilidade que sempre mostrou ao longo de toda a realização do trabalho, tendo mostrado que estava sempre pronto a esclarecer todas as dúvidas e questões de forma clara. Com isto, permitiu sempre orientar-me de forma clara, possibilitando sempre a melhor construção do projecto de dissertação, pelo que desejo expressar o meu sincero reconhecimento.

Gostava de terminar, agradecendo à minha família e amigos, por todas as experiências que me proporcionaram e por sempre me terem demonstrado o seu apoio.

Muito obrigada a todos.

V. Índice

VI. Introdução.....	11
1. Papel fisiológico das ROS	14
VII. Espécies reativas como agentes oxidantes	19
1. Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)	19
VIII. Efeitos oxidativos em moléculas específicas.....	22
1. Lipoperoxidação	23
2. Proteínas	24
3. DNA	25
4. Apoptose e Necrose	26
IX. Defesa antioxidante	28
1. Sistemas Enzimáticos	30
i. Superóxido Dismutase	30
ii. Glutaciona Peroxidase	31
iii. Glutaciona Redutase	32
iv. Catalase	32
2. Sistemas Não Enzimáticos	34
i. Antioxidantes e proteção conferida	36
X. Formas de determinar a ocorrência de stress oxidativo.....	40
XI. Substâncias que promovem stress oxidativo	42

1. Fármacos.....	42
2. Classificação terapêutica e efeito ao nível do stress oxidativo.....	44
i. Anti-maláricos	44
ii. Anti-epiléticos	45
iii. Anti-inflamatórios não esteróides	46
iv. Anti-fúngicos.....	50
v. Dietilditiocarbamato de sódio (DDC)	50
XIII. Conclusões.....	53
XIV. Referências Bibliográficas.....	55

VI. Introdução

Muitos compostos, na sua forma nativa, apresentam uma toxicidade relativamente baixa. No entanto, sob a ação de determinadas enzimas no organismo, ocorre uma conversão em formas intermediárias que interferem com a fisiologia e com a bioquímica normal (Eaton & Gilbert, 2008). Este processo de conversão biológica de uns compostos noutros denomina-se biotransformação e a sua ocorrência é fundamental para que muitos intermediários sejam consideravelmente mais tóxicos do que as substâncias iniciais.

Os efeitos tóxicos num sistema biológico não serão produzidos por um agente químico, a menos que esse agente ou os seus produtos de degradação metabólica atinjam um local apropriado no organismo, e numa concentração e período de tempo suficientes para produzir uma manifestação tóxica (Eaton & Gilbert, 2008). Assim, a principal razão porque alguns fármacos específicos são tóxicos para um, mas não para outro tipo de tecido, é porque existem diferenças na acumulação do composto tóxico final nos vários tecidos. Por sua vez, isto pode acontecer devido a diferenças na capacidade de vários tecidos em transportar e biotransformar o químico no produto tóxico final (Eaton & Gilbert, 2008).

Muitos agentes tóxicos podem interferir com a manutenção das funções celulares. Considerando um organismo multicelular, as células são obrigadas a manter a sua própria integridade estrutural e funcional, bem como fornecer funções de suporte para outras células. Porém, a manutenção dessas funções pode ser interrompida por químicos, como resultado de uma resposta tóxica (Gregus, 2008). As células, normalmente modulam os seus sistemas de resposta ao stress, através de proteínas reguladoras, que detetam o agente causador de stress, ou de um mensageiro. Com estes mecanismos, a célula pode causar alterações ao nível da transcrição, ou ocasionalmente ao nível da translação ou da proteólise (Kumar *et al.*, 2011).

Dependendo essencialmente do grau e do trajeto da exposição, os químicos podem afetar a função ou a estrutura de organismos vivos. A caracterização qualitativa e quantitativa destes efeitos tóxicos, é fundamental para a avaliação do perigo potencial representado por cada químico em particular. Contudo, por vezes, um xenobiótico não

reage diretamente com a molécula alvo específica, mas influencia de forma adversa o microambiente biológico, causando disfunções a nível molecular, celular e dos organelos, levando a efeitos deletérios (Eaton & Gilbert, 2008).

Deste modo, verifica-se que a mais complexa via de toxicidade envolve várias etapas. Primeiramente, o tóxico é entregue ao alvo ou alvos, após o qual o produto tóxico final interage com moléculas-alvo endógenas, estimulando perturbações na função celular e/ou na estrutura, o qual inicia mecanismos de reparação celular, celular, bem como mecanismos de adaptação que têm como objetivo, diminuir a entrega, aumentar a capacidade de reparação e compensação para a disfunção. Quando as perturbações induzidas pela substância tóxica excedem a capacidade adaptativa e de reparação, ou quando a reparação e adaptação se torna ineficiente, ocorrem fenómenos de toxicidade (Eaton & Gilbert, 2008).

De acordo com Oliveira e Schoffen (2010), a célula normal está confinada dentro de um intervalo estrito de estrutura e função dos seus programas genéticos de metabolismo, diferenciação e especialização e pelas limitações das células vizinhas e também pela disponibilidade dos substratos metabólicos. Por conseguinte, é defendido que condições de stress fisiológico excessivo e ação de alguns estímulos patológicos, podem levar a alterações da fisiologia celular e a adaptações morfológicas. Assim, se os limites da resposta adaptativa aos estímulos forem excedidos, ou se o ajuste for impossível, podem ocorrer uma série de eventos que causam dano celular, que em último caso, podem ser irreversíveis. Portanto, se os estímulos forem intensos e contínuos desde o início, a célula atinge um ponto de não retorno e sofre danos irreversíveis, seguidos de morte celular (Oliveira e Schoffen, 2010).

O oxigénio não é necessariamente uma molécula essencial para o processo de geração de energia e muitos organismos vivem recorrendo ao processo de glicólise para garantir todas as suas necessidades (McKee, 1999). Classicamente, a respiração aeróbia, segundo Di Giulio & Newman (2008), representa-se, de forma em que a molécula de oxigénio age como o aceitador terminal de eletrões, que é reduzido, em última análise, em água, quando intermediários de elevada energia (NADH e FADH₂), são oxidados e a energia celular é capturada como ATP.

Perante uma situação em que ocorre um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, ocorre aquilo que se designa por stress oxidativo (Barbosa *et al.*, 2010; Frustaci *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2011; Oliveira e Schoffen, 2010). Frustaci *et al.* (2012), refere que esta situação de stress oxidativo pode desencadear ou aumentar a ativação de mastócitos, que induz a secreção de vários vasodilatadores, e moléculas pró-inflamatórias, tais como a histamina, o óxido nítrico ou o fator de crescimento endotelial vascular.

Deste modo, e segundo refere Barbosa *et al.* (2010), o stress oxidativo pode ser caracterizado por um desequilíbrio existente entre compostos com função oxidante e as defesas antioxidantes endógenas (Tacchini, 2002), em que fica favorecida uma geração excessiva de radicais livres, quando comparado com a velocidade de remoção desses mesmos radicais (Kumar *et al.*, 2011). Todo este processo é responsável pela consequente perda da função biológica de algumas biomoléculas, devido à sua oxidação; assim, o stress oxidativo é um desequilíbrio homeostático que é passível de surgir e que se manifesta através de danos oxidativos contra células e tecidos.

No entanto, as funções das espécies reativas de oxigénio são mais vastas. Pandey & Rizvi (2010), demonstraram que as espécies reativas de oxigénio são geradas por processos metabólicos normais e estão envolvidas, de certa forma, como moléculas sinalizadoras e mecanismos de defesa como os observados na fagocitose, função dos neutrófilos, macrófagos e vaso-relaxamento, sendo que macrófagos e neutrófilos realizam uma procura constante de microrganismos, bem como de células que se encontrem danificadas (McKee, 1999). Desempenham assim um papel relevante na proteção do organismo contra agentes externos, ajudando a atividade dos neutrófilos e dos macrófagos, desde que tenham atividade bactericida através da degradação oxidativa de lípidos, proteínas e DNA microbiano (Oliveira e Schoffen, 2010). No entanto, e apesar destas funções fisiologicamente importantes, a sua geração excessiva ou não controlada é nefasta e leva ao stress oxidativo (McKee, 1999), ou seja, apesar da sua contribuição fundamental para os mecanismos de defesa celular, eles podem ter um efeito prejudicial para o organismo, se existir um seu aumento ou uma diminuição excessiva na produção de antioxidantes (Oliveira e Schoffen, 2010).

1. Papel fisiológico das ROS

Atendendo a situações em que há respostas inflamatórias, observa-se que estas são acompanhadas por um aumento da produção de ROS e RNS, porém, as citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, a IL-1 e TNF- α , melhoram os efeitos provocados pelas ROS (Leonard, 2012). Corroborando esta ideia, Tacchini (2002), refere que a reprogramação da expressão de genes emergiu como um mecanismo usado pelas células para responder e possibilitar a adaptação a mudanças adversas de ambiente ou a substâncias tóxicas. Maes *et al.* (2011), defende que as respostas inflamatórias são acompanhadas por indução de vias de stress oxidativo e nitrosativo. A participação do oxigénio nestes processos metabólicos está relacionada com a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS). Exemplos de ROS incluem radicais superóxido, peróxido de hidrogénio, radicais hidroxilo e átomo de oxigénio (McKee, 1999).

Os efeitos indiretos relacionados com o óxido nítrico (NO) referem-se a reações mediadas por espécies reativas de azoto, que derivam do metabolismo do óxido nítrico. Estes efeitos requerem que o CO seja inicialmente ativado pelo superóxido (O_2^-) ou oxigénio para formar as espécies reativas, que depois vão sofrer outras reações com respetivos alvos biológicos. Estas reações adquirem uma especial importância, quando as concentrações de NO são bastante altas ($> 1 \mu\text{mol/L}$) e por longos períodos de tempo. Os efeitos indiretos podem ainda ser divididos em stress oxidativo e nitrosativo (Wink, 2000).

McKee (1999), refere também que devido à elevada reatividade que caracteriza as espécies reativas de oxigénio, estas podem causar danos severos nas células vivas, se se formarem em quantidades significativas. Normalmente, a formação de ROS é mantida a um valor mínimo pela ação de mecanismos antioxidantes de defesa celular, ideia esta que também é defendida por Lushchak (2011).

Considerando Sonta *et al.* (2004), o stress oxidativo ocorre em tecidos vasculares. Entre as várias fontes potenciais, o NAD(P)H oxidase vascular tem tido um aumento da atenção como sendo a mais importante fonte de produção de ROS nos tecidos vasculares. Assim, estes autores estudaram que elevados níveis de glucose e ácidos gordos livres estimulam a produção de superóxido por via da proteína kinase (PKC),

dependente da ativação vascular de NAD(P)H oxidase, observada em células de cultura endotelial aórtica e células musculares lisas. Barbosa *et al.* (2010), corrobora esta ideia e afirma que as enzimas livres de NADP(H) oxidase são uma importante fonte de geração de radicais livres, sendo que, segundo este mesmo autor, existem pelo menos seis isoformas, que diferem no que diz respeito ao local de expressão e aos co-fatores necessários para a sua ativação. Mais concretamente, estas enzimas são proteínas transmembranares altamente especializadas em transferir elétrons através das membranas celulares; sendo que o recetor habitual de elétrons é o oxigénio, em consequência deste processo há geração de radicais superóxido (Barbosa *et al.*, 2010).

Segundo Echeverri-Ruíz e Mockus-Sivickas (2010), é possível definir uma situação de stress oxidativo como um estado em que a célula não apresenta as condições ótimas de sobrevivência, sendo o stress oxidativo uma condição que implica a geração de radicais livres nocivos para as estruturas celulares. De acordo com o preconizado por Barbosa *et al.* (2010), a produção contínua de radicais livres que ocorre durante os processos metabólicos, leva ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, que têm como principal objetivo limitar os níveis intracelulares de espécies reativas, e assim fazer um controlo de possíveis danos oxidativos que pudessem ocorrer.

As espécies reativas de oxigénio são geradas durante muitas outras atividades celulares, além da redução do oxigénio para formar água. Estas incluem o metabolismo de xenobióticos e explosão respiratória nos glóbulos brancos. Adicionalmente, os elétrons, por vezes, difundem através das vias de transporte de elétrons na mitocôndria e no retículo endoplasmático, formando o radical superóxido, através da combinação com o oxigénio.

Para se protegerem a si mesmos do stress oxidativo, muitos organismos desenvolveram evolutivamente mecanismos de defesa antioxidante que empregam metaloenzimas e molécula antioxidantes (McKee, 1999) que previnem a acumulação de moléculas alteradas por oxidação (Vannuchi *et al.*, 1998). Assim, sob circunstâncias normais, os mecanismos de defesa que têm por base a capacidade antioxidante, minimizam qualquer dano que possa ocorrer (McKee, 1999). Atendendo a que a mitocôndria é o local onde ocorre a maior produção de ROS, é possível criar stress oxidativo, que pode levar à

disfunção de organelos e em último caso, à morte celular. A mitocôndria tem sido também frequentemente envolvida em fenômenos de toxicidade de vários fármacos, bem como de outros xenobióticos, pelo que tem sido largamente estudada (Tripathi *et al.*, 2011).

Maes *et al.*, (2011), refere igualmente que o stress oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre uma relativa escassez nas defesas antioxidantes, e um aumento da produção de espécies reativas, causada por baixas concentrações de antioxidantes no corpo e baixa atividade de enzimas antioxidantes. Além disso, é agora reconhecido que certos tipos de células têm a capacidade de produzir elevadas quantidades de ROS. Por exemplo, os macrófagos e neutrófilos fazem uma pesquisa constante pelo organismo de microorganismos que possam vir a causar danos celulares, conduzindo à produção de ROS que vão ser usados para destruir e dismantelar essas células (McKee, 1999).

Os nutrientes essenciais atuam bloqueando a ativação do fator de transcrição nuclear Kappa-Beta (NF- κ β), que faz a modulação da produção de mediadores inflamatórios e de moléculas de adesão e é um regulador sensível a substâncias oxidantes. Contudo, a baixa ingestão de antioxidantes pode ser o fator responsável para que ocorra a ativação do NF- κ β (Volp *et al.*, 2010).

Existem diversos fatores, tanto naturais como exógenos, que podem ser responsáveis pela ocorrência de stress oxidativo. Os fármacos, tal como já foi referido, são, entre muitos fatores, responsáveis pelo surgimento dessa situação, bem como exposição a contaminantes ambientais ou a radiações ultravioletas ou radiações ionizantes (McKee, 1999). Deste modo, nas situações de stress oxidativo, alguns danos são passíveis de ocorrer. Estes danos podem consistir em inativação enzimática, despolimerização de polissacarídeos, rutura de ácido desoxirribonucleico (DNA) e destruição de membranas biológicas. Por conseguinte, algumas doenças, como por exemplo a ocorrência de cancro, enfarte do miocárdio, processos inflamatórios e de envelhecimento (McKee, 1999), doenças neuro-degenerativas (Barbosa *et al.*, 2010), hipertensão, angiopatia diabética (Sonta *et al.*, 2004) e ainda aterosclerose (Echeverri-Ruiz e Mockus-Sivickas, 2010; Kumar *et al.*, 2011), têm sido associados à formação de derivados de oxigénio, tais como os ROS.

Assim, é possível sustentar que os radicais livres, incluindo ROS têm então estado implicados em vários aspetos de lesão vascular, incluindo a oxidação de lipoproteínas, hipertrofia de células musculares lisas e disfunção de células endoteliais. Por conseguinte, vários mecanismos têm sido postulados, como o aumento da formação de produtos de glicosilação avançada, aumento da libertação de superóxido pela mitocôndria, aumento da atividade da xantina oxidase e ativação da NAD(P)H oxidase (Sonta *et al.*, 2004). Leonard (2012), esclarece que a mitocôndria produz a maior parte da energia para a célula, armazenando sob a forma de ATP através de processos β -oxidativos. Tal situação leva a que sejam constantemente gerados ROS e RNS que podem provocar danos no mDNA, bem como na estrutura lipídica da membrana da mitocôndria. O mesmo autor refere que antioxidantes específicos, como a coenzima Q10, ácido lipóico e glutathione peroxidase, conferem à mitocôndria proteção, contra estes efeitos nefastos.

Echeverri-Ruíz e Mockus-Sivickas (2010), defendem que a teoria dos radicais livres e a sua relação com o processo de envelhecimento, propõem que o envelhecimento normal resulta de danos que ocorrem ao acaso nos tecidos, em consequência de stress oxidativo, causado pelas ROS. Desta forma, e considerando este raciocínio, é expetável que animais mais velhos apresentem mitocôndrias defeituosas, e podem produzir níveis mais elevados de ROS comparativamente com animais mais novos.

Além disso, a exposição a calor, agentes tóxicos ou condições desfavoráveis, como por exemplo, situações de stress oxidativo, podem ativar a transcrição de genes, que são definidos como genes de stress, que codificam para proteínas de stress (Tacchini, 2002). A primeira etapa da transcrição depende da atividade de fatores específicos de proteínas conhecidas por fatores de transcrição (TFs) e ainda que esses fatores possam, de forma isolada, ter um papel determinante na expressão de certos genes. Geralmente, a ativação da transcrição envolve a ação sinérgica de mais do que um fator de transcrição específico (Tacchini, 2002). De acordo com o mesmo autor, o promotor de cada sequência genética contém várias sequências para cada TFs diferente que pode potenciar um papel de indução de expressão, contudo, a ativação da ligação de DNA desses TFs, pode não implicar necessariamente que esse gene venha a ser ativado (Tacchini, 2002). Assim, verifica-se que a exposição das células a condições de stress,

resulta na ativação de várias vias de transdução de sinal, que culminam na indução ou estimulação de genes específicos.

Estudos têm mostrado que os ROS podem desempenhar função intracelular de segundos mensageiros e que o stress oxidativo pode ser um mediador comum da apoptose, talvez pela via de formação de hidroperóxidos lipídicos (Hickey *et al.*, 2001).

VII. Espécies reativas como agentes oxidantes

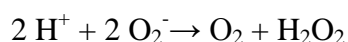
Entende-se por radical livre um átomo ou molécula que tem um ou mais pares de elétrons desemparelhados nas orbitais externas (Oliveira e Schoffen, 2010; Vannucchi *et al.*, 1998). A presença de um ou mais destes elétrons desemparelhados, determina uma atração para um dado campo magnético, o que pode ser responsável por tornar uma substância bastante reativa (Oliveira e Schoffen, 2010; Vannucchi *et al.*, 1998). Consequentemente, são intermediários químicos com vida extremamente curta e que têm uma tendência para adquirir um elétron de outras substâncias, tornando-as altamente reativas e capazes de atingir alvos celulares, como por exemplo membranas (Mayes, 2000; Vannucchi *et al.*, 1998). Contudo, nem todas as ROS são radicais livres, como por exemplo, o oxigénio molecular e o peróxido de hidrogénio.

1. Formação de espécies reativas de oxigénio (ROS)

Quando o oxigénio é reduzido a água pelo citocromo oxidase, são adquiridos quatro elétrons. Mayes (2000), considera também que, por vezes, é possível ganhar elétrons, um de cada vez, através de uma redução univalente que pode ser responsável pelo consumo de um a cinco por cento do total de oxigénio consumido. Em consequência disto e, atendendo a que uma molécula individual numa redução univalente é extremamente reativa, há uma elevada possibilidade de ocorrerem reações com estruturas celulares, com consequentes danos a nível dos tecidos. Então, o radical livre do anião superóxido, peróxido de hidrogénio e radical livre de hidroxilo, são os maiores responsáveis por esses danos. Posto isto, verifica-se que a citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo que sejam formados em excesso na mitocôndria (Barbosa *et al.*, 2010).

A molécula diatómica de oxigénio é um dirradical, ou seja, (constituída por dois radicais), e as propriedades do oxigénio estão diretamente relacionadas com a sua estrutura molecular. Desta forma, o dióxigénio é considerado um dirradical, pois possui dois pares de elétrons desemparelhados. Assim, por esta e por outras razões, quando ele reage, a molécula de oxigénio tem capacidade para aceitar apenas um elétron de cada vez (McKee, 1999).

A primeira espécie reativa de oxigénio formada durante a redução do oxigénio é o radical superóxido (O_2^-) (McKee, 1999; Wink, 2000) devido à adição de um eletrão ao oxigénio no estado fundamental (Vannucchi *et al.*, 1998). Este primeiro radical vai atuar como nucleófilo e, sob condições específicas, tem a capacidade de conseguir atuar tanto como agente oxidante, que age como recetor de eletrões das moléculas que oxida (McKee, 1999; Vannucchi *et al.*, 1998) ou agente redutor, que doa eletrões, e a adição de mais um eletrão resulta na formação do ião peróxido (O_2^{2-}), que não é considerado um radical (Vannucchi *et al.*, 1998). Deste modo, devido às suas propriedades de solubilidade (lipofílico), o radical superóxido, é capaz de causar danos consideráveis nos componentes fosfolipídicos das membranas (McKee, 1999). Quando este radical é gerado em ambiente aquoso, acaba por reagir consigo mesmo produzindo uma molécula de oxigénio (O_2) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), segundo a seguinte equação:



O peróxido de hidrogénio formado na reação anteriormente descrita não é considerado um radical, dado não possuir nenhum par de eletrões não ligante. A reação que se segue ocorre entre o H_2O_2 e o Fe^{2+} ou outro metal de transição e resulta na produção de um radical hidroxilo ($\cdot OH$), que é uma espécie altamente reativa.



Radicais (como o hidroxilo), são especialmente perigosos, uma vez que são altamente reativos e podem iniciar uma reação autocatalítica em cadeia. Porém, a sua taxa de difusão apenas se dá a uma curta distância antes que ele reaja com qualquer biomolécula e colida com ele. Metais de transição específicos, como por exemplo o ferro, podem reagir com peróxidos e superóxidos, formando desta forma, poderosas espécies como oxo-metal ou radicais hidroxilo (Wink, 2000). Em suma, podemos incluir nas ROS e RNS o anião superóxido, radicais hidroxilo, peróxido de hidrogénio, radicais peroxil lipídico, óxido nítrico e peroxinitrito, que são gerados por diferentes sistemas celulares através de reações enzimáticas e não enzimáticas (Pandey & Rizvi, 2010).

Tal como referido anteriormente, os iões ferro e cobre são muito ativos em reações de oxidação-redução, o que os torna eficazes catalisadores de reações de geração de

radicais livres, sendo que a sua participação passa por reações, designadas de Fenton e Haber-Weiss. Assim, considera-se que na reação de Fenton, ocorre a geração do radical superóxido, devido à reação do peróxido de hidrogénio com os iões, enquanto que na reação de Haber-Weiss os iões catalisam a reação do peróxido de hidrogénio com o radical superóxido, com o objetivo de gerar o radical hidroxil (Barbosa *et al.*, 2010).

VIII. Efeitos oxidativos em moléculas específicas

Os radicais livres, átomos ou moléculas com um eletrão não emparelhado, podem estar relacionados com o envelhecimento, pois o DNA nas células somáticas pode estar suscetível a deteriorações mais diretas, que resultam em mutações somáticas. Tal situação, pode, então, levar ao surgimento de disfunções celulares e, em último caso, à morte celular (Seeley, 2003), pois estes radicais atuam nas células alterando as características moleculares das membranas, promovendo mutações genéticas e perturbando a homeostasia celular e colaborando com a formação de resíduos químicos e outros componentes ligados ao processo de envelhecimento (Oliveira e Schoffen, 2010). Assim, e em consequência da sua acumulação, os radicais livres podem ser outra causa possível de cancro (Kim e Lee, 1997). Além disso, tem sido descrito que a reação entre as ROS e lípidos celulares ou DNA, provocam peroxidação lipídica, devido à indução da oxidação da membrana poli-insaturada dos ácidos gordos (Milatovic *et al.*, 2011) e fragmentação de DNA (Amin, 2005), nomeadamente devido à ação do radical superóxido, que tem sido indicado como sendo o de maior potencial reativo e de elevada instabilidade, características estas que fazem com que este radical esteja apto para induzir danos oxidativos (Barbosa *et al.*, 2010).

Assim, mediante a concentração em que eles se encontrem, têm várias consequências, ou seja, se estiverem presentes em baixas concentrações, são capazes de induzir a resposta mitogénica, enquanto que se estiverem presentes em concentrações mais elevadas, provocam danos em lípidos, nas proteínas presentes nas membranas celulares e ainda no DNA (Echeverri-Ruíz e Mockus-Sivickas, 2010; Leonard, 2012). Contudo, esta condição também varia de acordo com os organismos, tipo de célula e mesmo entre células do mesmo tecido, por intermédio da diversificação da capacidade antioxidante (Oliveira e Schoffen, 2010). O cérebro, por exemplo, caracteriza-se por ter uma elevada taxa metabólica e baixos níveis de antioxidantes, e por conseguinte, é bastante vulnerável a espécies reativas (Leonard, 2012). Atendendo a que o cérebro tem uma reduzida capacidade antioxidante, isto faz com que os níveis de proteção contra ROS e processos inflamatórios sejam relativamente baixos (Leonard, 2012).

Em função do acima referido, é importante considerar que existem, fundamentalmente, três reações que são relevantes para o dano celular, em que a primeira diz respeito à lipoperoxidação das membranas, a segunda tem que ver com a modificação oxidativa nas proteínas e, por último, a reação que envolve lesões que podem ocorrer ao nível do DNA (Oliveira e Schoffen, 2010), que podem ocorrer devido à inibição do complexo mitocondrial, que leva à depleção de energia e serve como uma fonte de espécies reativas, causando os danos oxidativos e comprometimento de função celular em vários locais alvo (Milusheva *et al.*, 2010).

1. Lipoperoxidação

Durante a vida, a formação de radicais livres, tal como referido anteriormente, pode levar ao aparecimento de fenómenos de peroxidação lipídica das membranas celulares (Agarwal *et al.*, 2011), desequilíbrios na homeostasia do organismo, mutações genéticas e surgimento de doenças, conduzindo à morte celular. Além disso, Agarwal *et al.* (2011), defende que o aumento de radicais livres leva à destruição neuronal através do aumento da peroxidação lipídica, diminuição dos níveis de glutatona e de superóxido dismutase e ainda da diminuição da atividade da catalase.

Os radicais livres são produtos normais do metabolismo celular aeróbio, porém, quando a produção de radicais livres aumenta ou os mecanismos de defesa do corpo diminuem, estes radicais causam disfunção celular, através do ataque nos locais poli-insaturados das membranas biológicas, levando a peroxidação lipídica (Agarwal *et al.*, 2011). O radical superóxido é o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica que leva à alteração da função biológica das membranas celulares, sendo que também consegue atuar nas proteínas, alterando a sua função biológica e a sua estrutura (Barbosa *et al.*, 2010). Tripathi *et al.* (2011), defende que a lipoperoxidação celular é tida como a maior causa de destruição membranar e dano celular, uma vez que gera grande quantidade de produtos de degradação, como o malondialdeído (MDA).

Os lípidos polinsaturados, que estão presentes nas membranas de organismos superiores, são uma classe de moléculas que são particularmente suscetíveis a sofrer danos por oxidação, resultando em lipoperoxidação (Hickey *et al.*, 2001). Desprotegidas, estas moléculas tornam-se mais suscetíveis à ação de radicais livres, por

reação de auto-oxidação, que representam uma ameaça significativa à sua integridade e funcionalidade. As situações de lipoperoxidação ocorrem quando as duplas ligações dos ácido gordos insaturados da membrana lipídica são atacados por radicais livres que derivam do oxigênio, particularmente, o radical superóxido. As interações entre lípido e radical geram peróxidos, que são instáveis e reativos e conseguem sobreviver a uma reação auto-catalítica em cadeia, da qual pode resultar um extenso dano tanto nos organelos, como nas membranas celulares (Oliveira e Schoffen, 2010). Contudo, a presença de abundantes radicais livres antioxidantes, como o α -tocoferol e reduzida concentração de ubiquinona, permite manter essa tendência de sofrer auto-oxidação em níveis relativamente reduzidos, conferindo assim, uma excelente proteção contra possíveis danos (Valentine, 2007).

2. Proteínas

Num estudo publicado por Pandey & Rizvi (2010), fica claro que as proteínas são vulneráveis ao stress oxidativo, por ataque de ROS, pelo que acabam por surgir fenómenos de oxidação, formação de fragmentos carbonilados e produtos avançados de oxidação proteica (AOPPs). Todavia, as proteínas são talvez o veículo mais importante para causarem stress oxidativo nas células, uma vez que elas são muitas vezes catalisadores, ao invés de mediadores estequiométricos (Pandey & Rizvi, 2010).

O dano oxidativo prolongado em vários locais do cérebro, tem sido sugerido como sendo a maior causa responsável de complicações, a longo termo, como anomalias morfológicas e dano cognitivo em desordens neuro-degenerativas (Agarwal *et al.*, 2011).

É bem designado que a exposição de proteínas a ROS pode levar a uma alteração das suas estruturas e propriedades físico-químicas, motivando a oxidação de grupos existentes na cadeia lateral, cisão proteica, fragmentação da estrutura principal, reticulação e desdobraimento. Tais alterações surgem como consequência da formação de novos grupos reativos, oxidação de grupos tiol (-SH), formação de ditirosina, contendo produtos de ligação cruzada de proteínas, conhecidas como produtos de oxidação avançada de proteínas (AOPPs) (Pandey & Rizvi, 2010). Portanto, conclui-se que a modificação das proteínas devido ao dano oxidativo, pode ocorrer devido à ação

de radicais livres oxidantes que oxidam as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, formando ligações cruzadas de proteína-proteína e oxidando o esqueleto da proteína, resultando daqui, a fragmentação da biomolécula (Oliveira e Schoffen, 2010).

3. DNA

Os radicais hidroxilo reagem com todos os componentes do DNA, formando adutos do tipo 8-oxo-2-O-desoxiguanina (Oxo8dG), acabando por danificar as suas bases de purina e pirimidina, e também alterar o vínculo de desoxirribose. Tal situação acaba por induzir modificações permanentes no material genético, que resultam em dano oxidativo, o que institui o passo inicial para a mutagénese, carcinogénese e envelhecimento. Echeverri-Ruíz e Mockus-Sivickas (2010), referem ainda que uma célula humana está exposta a aproximadamente $1,5 \times 10^5$ choques oxidativos por dia, por radicais livres e outras espécies reativas. Além disso, Leonard (2012), refere ainda que o processo de formação destas espécies reativas, envolve a reação não só com proteínas e ácidos gordos, mas também com DNA mitocondrial. Tal situação, pode ser responsável pela alteração das funções e estrutura química da membrana de ácidos gordos, através de processos oxidativos e ainda, por alteração funcional de proteínas, devido à ocorrência de processos oxidativos e nitrosativos. Oliveira e Schoffen (2010), refere que as lesões que ocorrem no DNA, ocorrem através de ligações com a timina no DNA nuclear e mitocondrial, levando à produção de quebras no DNA e alterações nos processos de obtenção de energia ao nível mitocondrial. As ROS ao actuarem sobre o DNA mitocondrial, podem também causando efeitos que envolvem mutações em genes mitocondriais, relacionados com o processo de carcinogénese (Echeverri-Ruíz e Mockus-Sivickas, 2010).

Os danos no DNA podem induzir a paragem do ciclo celular, a indução da transcrição, o estímulo de vias de sinalização, erros na replicação e instabilidade genómica e ainda processos associados a carcinogénese. O papel de transição de permeabilidade mitocondrial é um mecanismo não específico de dano mitocondrial que pode levar a fenómenos de apoptose e/ou de necrose e tem adquirido relevante importância, pelo que tem sido alvo de intensos debates e resultados contraditórios (Tripathi *et al.*, 2011).

4. Apoptose e Necrose

Vairetti *et al.* (2005), defendem que a apoptose e a necrose estão envolvidas numa variedade de alterações morfológicas e bioquímicas, e um aumento na oxidação intracelular, pode determinar a ocorrência de apoptose ou de necrose.

Hickey *et al.* (2001), menciona que existem dois tipos fundamentais de morte celular, apoptose e necrose. Entende-se por apoptose a morte celular programada, em que as células programam meticulosamente a sua própria morte antes de enfrentarem uma complexa sequência de perturbações que, segundo Tripathi *et al.* (2011), são iniciadas por um estímulo específico. Por necrose, entende-se a morte celular não programada ou acidental e que normalmente segue danos químicos ou patológicos, e ocorre quando a célula recebe um químico prejudicial que causa danos estruturais ou irreparáveis na célula (Oliveira e Schoffen, 2010), pelo que se conclui que é uma consequência de uma forte perturbação metabólica, como ocorre numa situação de hepatotoxicidade induzida por fármacos (Tripathi *et al.*, 2011). O mesmo autor, defende que o mais característico é o facto de as células morrerem devido a danos que sofrem e também a desintegração e digestão por ação das suas próprias enzimas líticas (Oliveira e Schoffen, 2010).

Hickey *et al.* (2001), defende ainda que, atualmente, está bem estabelecido que a apoptose se caracteriza por uma fragmentação ordeira do DNA e migração morfológica e sequencial da cromatina e condensação e desintegração celular sem resposta inflamatória e fagocitose de células vizinhas (Hickey *et al.*, 2001), que se caracteriza por existir uma remoção das células indesejadas do hospedeiro, através da ativação de eventos programados (Oliveira e Schoffen, 2010). Este processo, ocorre durante o desenvolvimento, como um mecanismo de defesa e um processo homeostático capaz de manter as células nos tecidos quando ocorrem erros devido a doenças ou processos de envelhecimento (Oliveira e Schoffen, 2010). Surge também num estudo desenvolvido por Oliveira e Schoffen (2010), que a exposição a pequenas doses de peróxido de hidrogénio ou a acumulação de ROS pela redução de glutatona, induz a apoptose descontrolada em células fúngicas, o que indica que os ROS são reguladores chave da apoptose nos organismos.

No que concerne à necrose, devido ao aumento dos níveis de ROS no organismo, Oliveira e Schoffen (2010), afirma que a necrose pode ser devida à permeabilidade de transcrição mitocondrial, desativando o poder e recuperação de ATP celular. Segundo Regateiro (2005), a necrose é considerada um processo degenerativo passivo que pode ser induzido por tóxicos ou agressões físicas. Deste modo, considera que a agressão violenta a uma célula pode levar à necrose celular e, se essa agressão for muito violenta, pode provocar uma paragem temporária no ciclo celular, em que depois pode haver uma reparação integral das lesões do DNA, ou a reparação integral pode não acontecer e aí acumulam-se as lesões do DNA, por incapacidade de reparação integral (Regateiro, 2005). A necrose, leva ao aparecimento de edema celular, rutura das membranas plasmáticas e lise celular com vazamento de componentes celulares mantendo-se o núcleo aparentemente intacto, e é sabido que ROS estão diretamente envolvidos na indução tanto da apoptose, como da necrose (Huang *et al.*, 2012; Huk *et al.*, 2004; Regateiro, 2005; Vairetti *et al.*, 2005).

IX. Defesa antioxidante

Os organismos são providos de um sistema de defesa antioxidante que tem como função inibir ou reduzir os danos causados pela ação nefasta dos radicais livres ou de espécies reativas. O sistema referido pode dividir-se em dois grandes grupos, ou seja, num sistema enzimático, do qual fazem parte a glutathione peroxidase, a catalase e a superóxido dismutase (Kim e Lee, 1997; Tripathi *et al.*, 2011) e num sistema não enzimático, onde estão contempladas substâncias que tanto podem ser de origem endógena, como dietética (Barbosa *et al.*, 2010; Oliveira e Schoffen, 2010). O mecanismo de ação pelo qual atua esta defesa antioxidante pode, de acordo com Barbosa *et al.* (2010), ser de dois tipos diferentes, ou seja, pode atuar impedindo a formação de radicais livres ou espécies não-radicaais, impedindo a sua ação, ou então, pode atuar favorecendo a reparação ou reconstituição das estruturas biológicas lesadas.

Assim, torna-se relevante definir o que se entende por substância antioxidante, e Vannucchi *et al.* (1998), esclarece que uma substância antioxidante é aquela que quando se encontra presente em baixas concentrações comparativamente à concentração de substrato oxidável, apaga ou previne significativamente a oxidação desse produto. Por substrato oxidável, entende-se várias substâncias que tanto podem ser encontradas em alimentos, como em tecidos vivos, envolvendo proteínas, hidratos de carbono e DNA. Oliveira e Schoffen (2010), corroboram a ideia anterior, afirmando que as substâncias antioxidantes, têm capacidade de reduzir, proteger ou prevenir a expansão do dano oxidativo em biomoléculas, inativando ou prevenindo a geração de danos induzidos pelos radicais livres.

Ao processo de perda de um eletrão por parte de uma molécula designa-se oxidação. Os antioxidantes são fundamentalmente substâncias que evitam a oxidação dos componentes celulares, através da transferência de um eletrão aos radicais livres (Seeley, 2003) e segundo Barbosa *et al.* (2010), são qualquer substância que é capaz de inibir ou atrasar eficazmente a oxidação de um determinado substrato, sempre que se encontrem em menor quantidade que o substrato oxidável. A formação destes radicais tanto pode ocorrer através da perda de um único eletrão ou pelo ganho de um eletrão de uma substância não radical, sendo que eles podem ser formados quando se dá uma

quebra numa ligação covalente e um eletrão de cada um dos pares continua em cada átomo (Vannucchi *et al.*, 1998).

Tendo em linha de conta o estudo desenvolvido por Echeverri-Ruíz e Mockus-Sivickas (2010), os efeitos perniciosos das ROS podem ser compensados mediante a ação antioxidante enzimática e não enzimática. Porém, o efeito dos danos oxidativos, apesar da presença do sistema de defesa antioxidante, acumula-se ao longo de toda a vida de um ser vivo.

A produção de ROS e RNS é firmemente regulada por substâncias antioxidantes, enzimas com capacidade antioxidante e algumas proteínas, através da limpeza e ligação de ROS e RNS ou então, através da diminuição da produção destas espécies reativas. A coenzima Q10 (Leonard, 2012; Maes *et al.*, 2011), pró-vitamina A (β -caroteno), vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E (tocoferóis) (Maes *et al.*, 2011; Seeley, 2003) e a glutathione (Maes *et al.*, 2011) são antioxidantes importantes.

ROS como peróxidos e superóxidos podem também ser neutralizados através de diferentes enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPX) e catalase (Leonard, 2012; Maes *et al.*, 2011). Leonard (2012), considera também, que proteínas de fase aguda, tais como a haptoglobina e a albumina funcionam como antioxidantes através da ligação a ROS e RNS, bem como resíduos de triptofano e tirosina, que desempenham um papel fundamental como antioxidante em camadas lipídicas, protegendo as membranas celulares de danos oxidativos. Algumas proteínas, como por exemplo proteínas de fase aguda, como a transferrina e ceruloplasmina, também podem funcionar como antioxidantes, na medida que permitem a ligação de ROS e RNS, protegendo assim os tecidos (Maes *et al.*, 2011). Portanto, não há dúvida que os antioxidantes desempenham um importante papel na prevenção de doenças humanas, incluindo, mas não limitando, o cancro, aterosclerose, acidente vascular cerebral, artrite reumatóide e neuro-degeneração (Milatovic *et al.*, 2011).

1. Sistemas Enzimáticos

O sistema enzimático é composto por várias enzimas, designadas por Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR ou GSH) e Catalase (CAT) (Frustaci *et al.*, 2012; Oliveira e Schoffen, 2010). Barbosa *et al.* (2010), declara que as enzimas SOD, GPx e CAT atuam por mecanismo de prevenção impedindo ou controlando a formação de radicais livres envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que terminam com a ampliação e propagação do processo, que culmina com a ocorrência de danos oxidativos. Relativamente às enzimas CAT e GPx, elas atuam com a mesma finalidade, ou seja, de impedir que se acumule peróxido de hidrogénio (Barbosa *et al.*, 2010).

Atendendo ao facto de que o radical superóxido apresenta um elevado potencial e também o facto de não existir uma defesa antioxidante enzimática especializada, torna-se relevante a manutenção de um equilíbrio perfeito entre as enzimas antioxidantes, pelo que assim se torne possível manter a integridade celular (Barbosa *et al.*, 2010). Além disso, também pode ser necessário a presença de co-fatores enzimáticos, que variam, mediante os compartimentos celulares de ação enzimática e, que podem ser antioxidantes de origem dietética (Barbosa *et al.*, 2010). Por vezes, o uso de minerais, como o zinco e o selénio com um papel antioxidante, está ligado à dependência de enzimas antioxidantes por esses minerais (Oliveira e Schoffen, 2010). Consequentemente, níveis reduzidos destes minerais, podem levar a uma possível susceptibilidade à ocorrência de danos oxidativos nas células e nos promotores de processos de partenogénese (Oliveira e Schoffen, 2010).

i. Superóxido Dismutase

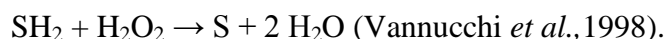
Esta enzima, é uma enzima antioxidante do cérebro (Agarwal *et al.*, 2011) e é uma proteína do eritrócito que tem a capacidade de remover cataliticamente os radicais superóxidos (Vannucchi *et al.*, 1998). É ainda responsável pela remoção do radical $O_2^{\cdot-}$, catalisando a dismutação, em que um radical $O_2^{\cdot-}$ é reduzido a H_2O_2 e outro é oxidado a O_2 (Maes *et al.*, 2011). Atendendo a que ocorre a remoção de radical $O_2^{\cdot-}$, há diminuição do risco de formação do radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Contudo, o H_2O_2 ainda é tóxico, e deve ser eliminado através da ação da catalase. Assim, ocorre dismutação direta do H_2O_2 em

O₂. O potencial reativo do anião O₂⁻ pode causar alterações conformacionais em enzimas dependentes do sulfidrilo e em proteínas através da oxidação do grupo -SH em S-S (Kim e Lee, 1997). Deste modo, verifica-se que esta é uma enzima que desempenha um importante papel na defesa contra ROS (Gill, 2012), pois esta enzima, encontrando-se em baixa quantidade, pode levar a efeitos adversos, devido ao facto de os aniões O₂⁻ serem extremamente tóxicos e poderem ficar acumulados nas células (Kim e Lee, 1997) e segundo Vannucchi *et al.* (1998), esta é uma metaloenzima, que contém cobre, zinco e manganês em sistemas eucarióticos e ferro e manganês no caso dos procarióticos. Barbosa *et al.* (2010), vai mais longe, afirmando que esta enzima pode ser encontrada sob duas formas, sendo que podem estar no citoplasma e aí é dependente do cobre e do zinco (SOD-Cu/Zn) e na mitocôndria, onde precisa do manganês como co-fator (SOD-Mn), sendo que Kim e Lee (1997), também corroboram a mesma ideia. Segundo Oliveira e Schoffen (2010), o zinco regula a expressão de metalotioneína e proteção de grupos sulfidrilo da membrana proteica.

ii. Glutathione Peroxidase

É preciso dar especial ênfase a esta enzima, que está envolvida na eliminação de radicais livres, pois a sua ação é dependente da manutenção do ciclo redox entre a glutathione reduzida e a glutathione oxidada. É também relevante considerar que esta enzima, à semelhança da superóxido dismutase, existe em várias isoformas, e segundo Maes *et al.* (2011), duas das quais estão presentes no sangue em elevada concentração. Dessas duas, uma é dependente e outra independente do selénio, sendo que pode apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (Barbosa *et al.*, 2010; Oliveira e Schoffen, 2010).

É importante salientar que uma das funções fisiológicas mais importantes do selénio é exatamente a de se assumir como constituinte da Glutathione Peroxidase (GPx), que desempenha um papel fundamental no combate ao stress oxidativo (Agarwal *et al.*, 2011), pois é um antioxidante enzimático (Volp *et al.*, 2010), que confere proteção contra o peróxido de hidrogénio, removendo-o de dentro das células (Vannucchi *et al.*, 1998), segundo a reação:



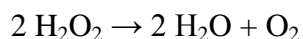
Atendendo ao estudo desenvolvido por Volp *et al.* (2010), o selénio é um mineral que se encontra associado ao correto funcionamento dos principais processos metabólicos celulares, conferindo proteção contra os danos causados pelo stress oxidativo. Propõe-se assim que a ingestão deste oligoelemento reduza o risco de aparecimento de doenças crónicas resultantes do estado oxidativo e inflamatório. Constata-se assim que a ingestão de selénio pode ser muito eficaz no que concerne à supressão da ativação de mediadores químicos que sustentam estados inflamatórios, através do aprisionamento de moléculas de radicais livres e favorecendo o sistema antioxidante de defesa, com um efeito direto da minimização do desenvolvimento de doenças crónicas, ficou demonstrado igualmente que o uso de suplemento com selénio reverte o aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (Volp *et al.*, 2010), contribuindo indiretamente para debelar um cenário de stress oxidativo.

iii. Glutationa Redutase

A glutaciona é um antioxidante endógeno que se encontra presente principalmente na forma reduzida no interior das células. A glutaciona reage com os radicais livres e previne a geração de radicais hidroxilo, que é a forma mais tóxica dos radicais livres. Durante o processo defensivo, a glutaciona reduzida é convertida à forma oxidada com a ajuda da enzima glutaciona peroxidase (Agarwal *et al.*, 2011).

iv. Catalase

As catalases, ou mais corretamente, hidroperoxidases, são uma das mais estudadas classes de enzimas (Chelikani *et al.*, 2004). Esta é uma hemoproteína citoplasmática, que existe nos principais órgãos, mas principalmente no fígado e eritrócitos. De acordo com Weston (2000), a sua atividade depende do NADPH e à semelhança da glutaciona peroxidase, esta enzima, nos lisossomas, tem a capacidade de remover o peróxido de hidrogénio do interior das células, formado pela ação da superóxido dismutase, em que dismuta o peróxido de hidrogénio a oxigénio e água, através da seguinte reação (Agarwal *et al.*, 2011; Chelikani *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2011; Nicholls, 2012; Vannucchi *et al.*, 1998).



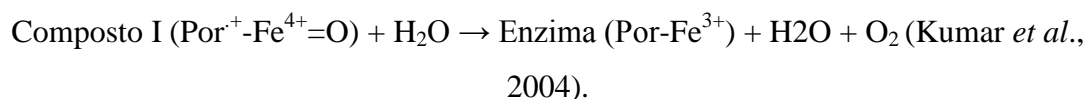
Esta reação global, aparentemente simples, pode ser dividida em duas etapas, sendo que o que está envolvido em cada uma delas, depende do tipo de catalase (Chelikani *et al.*, 2004).

As catalases, incluem as enzimas clássicas com grupo heme, um pequeno grupo de enzimas de manganésio e as catalase-peroxidases, enzimas heme que também têm ligações covalentes triplas em cadeias laterais (Nicholls, 2012). Chelikani *et al.* (2004), refere cada uma das três classes de forma mais detalhada. A primeira classe, é a mais difundida na natureza e também a mais estudada, é composta por grupos heme monofuncionais, contendo enzimas e que se subdivide, mediante apresente subunidades maiores (> 60 kDa) ou menores (< 60 kDa). A segunda classe, é composta por um composto bifuncional contendo grupos heme, contendo catalase-peroxidases que se relacionam diretamente com a sequência e estrutura de peroxidases vegetais. A terceira classe inclui o não-heme, ou catalases contendo manganésio, e por isso, inicialmente foram designadas de pseudocatalases. Estas, também incluem um diverso grupo de proteínas, todas contendo heme, que têm níveis de atividade peroxidásica muito baixos, que se devem à presença do grupo heme, que por si só exibe atividade catalítica. Aqui incluem-se as cloroperoxidases, peroxidases vegetais e mioglobina (Chelikani *et al.*, 2004).

As catalases contendo um grupo heme, e atuam por um mecanismo comum, que envolve duas etapas, para degradação do peróxido de hidrogénio. Primeiro, uma molécula de peróxido de hidrogénio oxida o heme, para uma espécie de oxiferril, em que um equivalente de oxidação é removido a partir do ferro e outro, a partir do anel de porfirina:

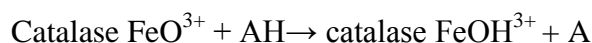
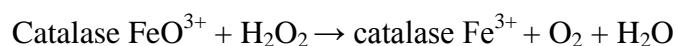
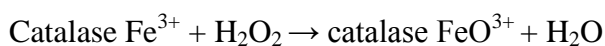


Seguidamente, a molécula de peróxido de hidrogénio é usada como redutora do composto I, para gerar a enzima, água e oxigénio:



Esta enzima medeia a sinalização na proliferação celular, apoptose, metabolismo de carboidratos e ativação de plaquetas (Maes *et al.*, 2011). É uma enzima constituída por dois componentes (I e II), sendo que o componente II, que é cataliticamente inativo é formado a partir do componente I. O componente II pode ser tratado como interruptor no tipo de coordenação do ferro de “iônico” a “covalente”. O componente I está envolvido em reações covalentes de peróxido com o círculo de porfirina (Nicholls, 2012).

As reações da catalase podem ser descritas, de acordo com Nicholls (2012), da seguinte forma:



2. Sistemas Não Enzimáticos

Neste sistema, estão englobados, essencialmente, os compostos antioxidantes de origem endógena ou dietética, e onde as vitaminas, minerais e compostos fenólicos estão em destaque (Frustaci e tal., 2012; Barbosa *et al.*, 2010). Plantas que contenham antioxidantes naturais, como taninos, flavonoides, vitamina C ou ácido ascórbico, e β -caroteno, precursores das vitaminas E (α -tocoferol) e A, respetivamente, também conferem proteção contra ROS (Patel, 2012; Barbosa *et al.*, 2010) e ainda componentes endógenos, como por exemplo a bilirrubina (Oliveira e Schoffen, 2010).

A coenzima Q10 é não só um antioxidante muito forte, como também é um agente anti-inflamatório, que tem como alvo a supressão do gene NF κ B (Leonard, 2012), bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias, pelo que confere resistência ao dano mitocondrial por ação dos ROS e RNS (Maes *et al.*, 2011).

Os carotenóides sem atividade de vitamina A, como o licopeno, luteína, também apresentam atividade antioxidante (Barbosa *et al.*, 2010). Os carotenóides caracterizam-

se por ter, pelo menos, dez ligações duplas conjugadas, o que vai conferir uma coloração amarelada ou alaranjada, bem como a sua forte capacidade de se fixarem ao oxigénio monomolecular durante os processos fotoquímicos, e de agir como agente antioxidante. Os carotenóides podem, então, ser encontrados nas frutas e legumes e são comumente referidos como tendo atividade antioxidante. A vitamina A, ou retinol, atua sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos (da Cunha e Roque, 2005).

Relativamente aos taninos, surge descrito na literatura que eles têm atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e têm também capacidade de complexar macromoléculas de natureza proteica, como por exemplo, enzimas digestivas. Vários estudos têm sugerido a existência de uma correlação entre o consumo de flavanóides e seus derivados e o decréscimo no risco de aparecimento de certas doenças, pois através de estudos *in vivo*, tem sido demonstrado que estes compostos intervêm na modulação de processos envolvidos na divisão e proliferação celular, na coagulação, inflamação e resposta imunológica (da Cunha e Roque, 2005).

O uso dos flavonóides pode contribuir para uma panóplia de benefícios, devido à sua atividade antioxidante. Há autores que defendem que essa atividade é devida à existência de grupos hidroxilo 3' e 4', sendo que estes compostos polifenólicos são inibidores de processos de peroxidação e de envelhecimento dos tecidos. Contudo, também é conhecido que eles podem atuar através de reações de complexação com o ferro, extinguindo um dos processos catalisadores da oxidação da vitamina C e dos lípidos. Além do já referido, a proteção da vitamina E nas membranas dos microsomas, também é responsável pela capacidade antioxidante destes compostos (da Cunha e Roque, 2005).

No que aos minerais diz respeito, Barbosa *et al.* (2010), dá ênfase ao zinco, ao selénio e ao magnésio. No estudo desenvolvido por Volp *et al.* (2010), observou-se que o selénio ajuda a neutralizar o excesso de ROS, bem como fenômenos de peroxidação lipídica. Este mecanismo está envolvido na redução do estímulo necessário para evitar a situação da cascata das citocinas pró-inflamatórias, entre elas a proteína C reativa (PCR), sendo a sua expressão, secreção regulada por citocinas, predominantemente IL-6, TNF- α e IL-1. Ao contrário, quando o processo oxidativo surge pelo aumento de peróxido de

hidrogénio e peroxidação lipídica, podem estimular a geração de IL-6, a qual estimula a produção de PCR.

Quando se estuda o potencial antioxidante *in vivo* de compostos não enzimáticos, é preciso atender a alguns fatores que podem interferir, nomeadamente a absorção, biodisponibilidade em condições fisiológicas, concentração plasmática ideal, tipos de radicais gerados no processo oxidativo e qual o compartimento em que são gerados e a forma como foram gerados (Barbosa *et al.*, 2010).

i. Antioxidantes e proteção conferida

A maior fonte de antioxidantes intracelulares é a dieta. Há provas incisivas que apontam que as fontes nutricionais de alimentos com propriedades antioxidantes, como frutas, legumes, chá ou vinho, contribuem para atenuar os danos teciduais causados por desafios oxidativos (Pandey & Rizvi, 2010). Porém, muitas vezes, na maioria dos estudos, só se contemplam compostos antioxidantes isoladamente e não como eles habitualmente surgem na alimentação, o que acarreta uma limitação de resultados, dado muitas vezes os alimentos atuarem em sinergia na proteção contra danos oxidativos a células e tecidos (Barbosa *et al.*, 2010).

Oliveira e Schoffen (2010), estudaram o efeito de vitaminas, como a vitamina A, E e C, flavonóides, carotenoides e minerais, restrição calórica e prática de exercício físico, e observaram os efeitos benéficos na saúde humana, nomeadamente os efeitos ao nível do stress oxidativo e atraso do envelhecimento celular.

O resveratrol é uma fitoalexina polifenólica que está naturalmente presente nas uvas, amendoins e vinho tinto. Este composto tem sido descrito como apresentando várias ações tanto a nível fisiológico como bioquímico, incluindo propriedades estrogénicas, anti-plaquetárias e anti-inflamatórias. Por conseguinte, o resveratrol tem sido encarado como sendo um potente antioxidante que pode inibir a geração de radicais livres no cérebro, espinal medula, fígado e membranas dos glóbulos vermelhos. Todavia, também tem sido demonstrado que o resveratrol pode exibir propriedades pró-oxidantes, conduzindo à quebra oxidativa de DNA celular, na presença de iões de metais de

transição tais como o cobre, dependendo da concentração de fitoalexinas e ainda do tipo de célula (Pandey & Rizvi, 2010).

Ao encontro do estudado por Pandey & Rizvi (2010), também Patel (2012) indica que os polifenóis, que podem ser classificados em vários grupos, como flavonóides, taninos e estilbenos, são conhecidos pelas suas propriedades benéficas para a saúde, nomeadamente na eliminação de radicais livres, inibição da atividade hidrolítica e de enzimas oxidativas.

Barbosa *et al.* (2010), verificou que a vitamina C apresenta uma intensa atividade antioxidante quando se encontra num meio com características hidrofílicas, pelo que podem não ser capaz de impedir a propagação de radicais livres num ambiente lipofílico. Por outro lado, os flavonóides têm capacidade de atuar como antioxidantes tanto num ambiente hidrofílico, como num ambiente lipofílico.

No que concerne à Vitamina E, Milatovic *et al.* (2011), descreve-a como sendo o mais potente e mais importante antioxidante. Segundo este autor, ela atua quebrando a cadeia antioxidante e eliminando os radicais, conferindo deste modo proteção às células da peroxidação nos fosfolípidos e consequente degradação da membrana. Além disso, a vitamina E, mantém a fosforilação oxidativa na mitocôndria e acelera a restituição de metabolitos de elevada energia. Esta vitamina pode ser encontrada nos óleos vegetais sob várias formas, como G-tocoferol, D-tocoferol, α -tocoferol e β -tocoferol, sendo que o α -tocoferol é a forma antioxidante largamente distribuída nos tecidos e no plasma (Oliveira e Schoffen, 2010). Esta vitamina é lipossolúvel, pelo que confere proteção à peroxidação lipídica das membranas celulares, impedindo as reações em cadeia, pois tem a capacidade de interferir com a propagação dos radicais lipídicos (Ryan *et al.*, 2010).

Relativamente à vitamina C, que pode ser encontrada nos citrinos, tomates, morangos e bróculos, ela atua eliminando os radicais livres e nutrindo as células (Oliveira e Schoffen, 2010). Esta é uma vitamina hidrossolúvel, encontrada no fluido extracelular e no citosol, que pode interagir diretamente com os radicais livres, prevenindo assim o dano oxidativo (Ryan *et al.*, 2010). Num estudo conduzido por Oliveira e Schoffen (2010), verificou-se que o nível plasmático de ácido ascórbico sofreu redução em

grupos animais diabéticos, comparativamente ao grupo controlo. É possível que isto se deva ao stress oxidativo, que promove um aumento da frequência de radicais livres e uma diminuição de substâncias responsáveis por combater esses radicais. As concentrações de ácido ascórbico nos tecidos também é reduzida, porque o seu transporte, durante a hipoglicémia, é reduzido.

Segundo Oliveira e Schoffen (2010), as vitaminas atuam, prevenindo o alastramento de reações induzidas por radicais livres nas membranas biológicas, minimizando, desta forma, os erros que daí podem advir e que já foram descritos anteriormente. Desta forma, é possível verificar que a combinação das vitaminas C e E, se traduz numa melhoria do efeito antioxidante quando comparado com o efeito de cada uma individualmente, e isto deve-se ao facto de apresentarem uma localização subcelular diferente (Ryan *et al.*, 2010). Porém, a vitamina C, mesmo em pequenas quantidades, tem a capacidade de proteger proteínas, lípidos, hidratos de carbono e ácido nucleico dos danos provocados por pró-oxidantes, formados durante o metabolismo normal (Ryan *et al.*, 2010).

É descrito que os carotenóides são precursores da vitamina A, e constituem a maior fonte de β -caroteno. Podem ser encontrados nos espinafres, cenouras, abóbora, manga, papaia e beterraba. A vitamina A, por seu turno, pode desempenhar papel de antioxidante ou de pró-oxidante, uma vez que os carotenóides influenciam a oxigénio simples, inibindo a peroxidação lipídica, descartando os radicais livres. Contudo, sob elevadas concentrações de oxigénio, há perda da atividade antioxidante (Oliveira e Schoffen, 2010).

Ryan *et al.* (2010), considera que os oxidantes gerados perto das membranas, podem oxidar a vitamina E, formando o radical tocoferoxil. Contudo, a vitamina C pode reduzir o radical da vitamina E, regenerando-a dessa forma. Esta reação forma o radical da vitamina C (semi-dihidroascorbato), que por sua vez, é reduzido pela glutathione.

Em relação a alguns flavonóides, flavonóis e flavonas, que são encontrados na fruta, vegetais, grãos inteiros e em ervas, o estudo de Oliveira e Schoffen (2010), defende que têm sido usados, na medicina, no tratamento de combate à osteoporose e inflamação,

pois eles conseguem inibir a produção de prostaglandinas, diminuindo a síntese de óxido nítrico, tendo assim uma importante característica antioxidante.

X. Formas de determinar a ocorrência de stress oxidativo

Sempre que se verifica que a produção de radicais livres ou espécies reativas é superior à capacidade que os antioxidantes têm de os eliminar, é mais do que provável que ocorram danos em biomoléculas, e em consequência desses danos, formam-se metabolitos específicos que são marcadores do stress oxidativo e que podem ser identificados e quantificados (Barbosa *et al.*, 2010). Esses marcadores, habitualmente derivam da oxidação das proteínas, DNA e lipoperoxidação, sendo que os últimos adquirem maior relevância. Além destes, também existem métodos indiretos baseados na capacidade antioxidante que permitem detetar situações de stress oxidativo (Barbosa *et al.*, 2010).

Atendendo a que a hiperglicemia pode induzir o stress oxidativo, este stress pode ser medido através de três mecanismos, que são a quantificação das atividades da NAD(P)H oxidase, da xantina oxidase e da cadeia transportadora de eletrões (Chakraborty, 2011).

No caso particular do estudo desenvolvido por Akanbi (2011), o stress oxidativo foi determinado pela medição dos níveis de lipoperoxidação, ácido ascórbico e glutatona reduzida no soro. Outro estudo, elaborado por Hickey *et al.* (2001), também utilizou a lipoperoxidação como indicador sensível à determinação de stress oxidativo nas células renais por intermédio do diclofenac. As células HepG2 são frequentemente empregues como ferramentas de avaliação dos efeitos oxidativos de numerosas substâncias. Como outra qualquer cultura modelo, o sistema celular HepG2 tem a limitação de extrapolação dos resultados *in vivo*, particularmente em humanos. Contudo, desde que as células HepG2 mantenham a maior parte dos hepatócitos morfologicamente normais e as características metabólicas, eles são comumente usados para identificar vias metabólicas e alvos metabólicos para estudar a hepatotoxicidade de fármacos, carcinogénese química – ativação metabólica e destoxificação, e como um modelo *in vitro* para respostas inflamatórias e alterações metabólicas na hiperglicémia e complicações relacionadas com o stress oxidativo (Raza, 2011).

A medição da geração intracelular de ROS também pode ser medida através de uma sonda fluorescente de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) sensível à

oxidação. O DCFH-DA é uma membrana permeável corante que pela ação das esterases celulares é de-esterificado a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂). O DCFH₂ é ainda oxidado a diclorofluoresceína fluorescente (DCF) por ação das ROS, essencialmente por ação do H₂O₂ e radicais hidroxilo (Tripathi *et al.*, 2011).

A avaliação da turgescência mitocondrial pode servir como um indicador biológico da ocorrência de fenômenos de stress oxidativo. Segundo Lal *et al.* (2009), os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), sob condições de stress oxidativo, contribuem para o inchaço da mitocôndria. Assim, os autores deste estudo, sugerem que as medições da turgescência mitocondrial detetam uma expansão do volume da matriz, que pode ser causada por uma acumulação de energia, que depende de solutos iônicos do volume externo, ou por uma acumulação da pressão osmótica colóide, que faz aumentar a pressão osmótica interna, levando à acumulação de água, expandindo desta forma o volume (Lal *et al.*, 2009). Deste modo, a turgescência pode ser monitorizada espectrofotometricamente. Porém, existem limitações a este método, pois uma diminuição na absorvância, pode dever-se a outros fatores, tais como a rutura na integridade da mitocôndria, devido ao uso de detergentes (Lal *et al.*, 2009).

XI. Substâncias que promovem stress oxidativo

Na primeira parte do presente trabalho, foi referido que um dos factores decisivos para o exercício de toxicidade de muitas substâncias é a sua activação metabólica. Alguns exemplos de substâncias com as quais tal acontece encontram-se na alimentação, e na medicação commumente utilizada. Um exemplo interessante reside no etanol: através do metabolismo hepático do etanol, há geração de acetaldeído e/ou ROS, através da enzima álcool desidrogenase e do CYP2E1. O etanol também diminui a GSH (glutathiona) e selénio na mitocôndria, reduz o fluxo de cisteína em GSH e aumenta a geração de ROS e RNS mitocondrial (Choi, 2012). Assim, é de supor que o etanol possa contribuir para o surgimento de stress oxidativo.

1. Fármacos

São relativamente comuns as reações adversas a fármacos e qualquer órgão pode ser o alvo principal, e até sistemas de órgãos podem ser conjuntamente afetados. É importante atender a que todos os fármacos podem não só gerar efeitos benéficos, como também lesivos, e podem ou não ter uma relação com a ação farmacológica para o qual foi destinado o fármaco (Rang *et al.*, 2008).

Assim, ou devido a elevadas concentrações de fármaco que acabam por ser tóxicas, ou devido aos seus metabolitos, pode ocorrer necrose. Porém, pode ainda ocorrer outra situação, pois metabolitos quimicamente reativos podem estabelecer ligações covalentes com moléculas alvo e induzir nelas uma alteração através de interações não covalentes. Aqui, o fígado é dos órgãos que adquire uma grande relevância, sendo que os hepatócitos são expostos a elevadas concentrações de metabolitos que vão sendo formados durante a oxidação do fármaco, por parte do citocromo P450 (Rang *et al.*, 2008).

Portanto, é necessário verificar quais os tipos de interações não covalentes que podem ocorrer. De entre estas, destacam-se a peroxidação lipídica e a geração de ROS, reações que levam à depleção da glutathiona e modificação de grupos sulfidrílo. Das interações covalentes com moléculas-alvo que também podem surgir, pode considerar-se, por

exemplo, a formação de complexos entre um metabolito e um fármaco (por exemplo, o paracetamol) e macromoléculas celulares (Rang *et al.*, 2008).

Dietilditiocarbamato de sódio, diclofenac e cetoconazol são três agentes quimioterapêuticos importantes que são comumente associados a hepatotoxicidade. Assim, num estudo desenvolvido por Amin (2005), estudou-se o efeito destes agentes, tendo sido possível concluir que existe uma correlação positiva entre a sua hepatotoxicidade e a fragmentação de DNA. Além disso, também estudaram a implicação do cálcio como um mediador potencial de stress oxidativo por indução de fármacos associados com a hepatotoxicidade.

Hickey *et al.* (2001), refere que os fármacos classificados como anti-inflamatórios não esteróides, pertencem a um diverso grupo de agentes químicos que partilham simultaneamente propriedades farmacológicas e largamente utilizados no controlo da dor e inflamação e, são habitualmente classificados de acordo com a sua classificação química. Habitualmente, os efeitos adversos mais comuns são associados ao desconforto gastrointestinal suave, porém, Asensio *et al.* (2007), refere que estes efeitos têm sido associados ao dano oxidativo, bem como Hickey *et al.* (2001), que estudou o efeito do diclofenac ao nível da nefrotoxicidade associada ao stress oxidativo e à fragmentação do DNA. Os resultados de uma série de experiências têm sido bastante explícitos, quanto à implicação do diclofenac em fenómenos de indução de nefrotoxicidade devido ao stress oxidativo. Assim, tem-se observado o colapso da integridade do DNA genómico numa endonuclease dependente de cálcio e o envolvimento de ambos na morte celular por apoptose e por necrose. Contudo, ainda não é sabido se o diclofenac induz lipoperoxidação como resultado do stress oxidativo devido ao impacto da produção de espécies de quinoneimina durante o metabolismo nos rins, ou se é devido aos efeitos posteriores das espécies de quinoneimina ou se é consequência dos fatores em conjunto (Hickey *et al.*, 2001).

Outros estudos são efetuados em outros animais e com outras substâncias, com intuito de observar o efeito que certos fármacos podem ter na indução de stress oxidativo. Assim, Bussuan *et al.* (2010), avaliaram o marcador de apoptose Faz ligante (FasL) num modelo de stress oxidativo induzido pelo azoximetano na cripta de cólon de ratos,

tendo aferido que este fármaco induziu o stress oxidativo, reconhecido através de uma diminuição significativa da expressão da FasL. A proteína Fas e o ligando Fas são duas proteínas que interagem para ativar uma das melhores vias apoptóticas definidas. A Fas e FasL são ambos membros da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF). A Fas é parte da família do recetor transmembranar e a FasL é parte da família da membrana associada à citocina. A ligação do ligando Fas ao seu recetor induz a apoptose. As interações do Fas entre o ligando e o recetor, desempenham um papel importante na regulação do sistema imunitário e na progressão do cancro. Quando se está perante uma situação em que há uma expressão elevada do ligando Fas à superfície da célula, foi provado que ocorre um derramamento da proteína e a forma solúvel do ligando Fas pode desencadear fortemente a apoptose, através de ligação ao Fas (Bussuan *et al.*, 2010).

2. Classificação terapêutica e efeito ao nível do stress oxidativo

i. Anti-maláricos

A cloroquina, é um dos poucos fármacos existentes usados no tratamento da malária, sendo largamente utilizada em África, devido ao seu custo reduzido, disponibilidade generalizada e à sua boa tolerância oral. Contudo, este fármaco já não pode ser usado no tratamento da malária causada por *Plasmodium falciparum*, devido ao desenvolvimento de resistências (Tafazoli, 2009). A amodiaquina, um derivado da cloroquina e 4-aminoquinolina é usado como profilaxia e tratamento de malária, principalmente contra *P. falciparum* resistentes à cloroquina (Tafazoli, 2009). Segundo refere o mesmo autor, a amodiaquina é rapidamente absorvida e extensamente metabolizada após administração oral, sendo que o principal metabolito deste fármaco é o N-desetilamodiaquina e outros metabolitos menores que são o 2-hidroxidesetilamodiaquina e N-bisdesetilamodiaquina.

O CYP2C8, é a principal isoforma hepática envolvida na remoção da amodiaquina e o seu metabolismo a N-desetilamodiaquina. A amodiaquina é rapidamente oxidada a aquinomeimina que reage rapidamente e diretamente com outras proteínas, formando conjugados tioéter. Esta oxidação fácil, é uma consequência da presença de p-hidroxianilina, que é uma porção adjacente a um núcleo aromático na molécula de

amodiaquina (Tafazoli, 2009). Desta forma, considerando o estudo desenvolvido por Tafazoli (2009), verificou-se que a citotoxicidade da amodiaquina em hepatócitos isolados de ratos, tem uma relação dependente da concentração. Segundo este autor, a amodiaquina na presença de peroxidase, forma radicais semiquinimeimina que reagem com o oxigénio para formar peróxido de hidrogénio. O aumento da suscetibilidade dos hepatócitos à amodiaquina pelo sistema de geração de H_2O_2 também poderia resultar em parte a partir da inativação da catalase pela amodiaquina, devido ao aumento significativo que se verificou nos níveis de H_2O_2 endógenos (Tafazoli, 2009).

Além do fármaco referido anteriormente, a primaquina também é um fármaco usado no tratamento da malária que causa stress oxidativo nos eritrócitos após a sua redução e subsequente auto-oxidação a partir do peróxido de hidrogénio (Tafazoli, 2009). Contudo, o estudo desenvolvido por Akanbi (2011), refere que o stress oxidativo em pacientes com malária é comum, nem que seja apenas o resultado da ativação de respostas imunes pela presença do parasita que causa esta patologia, libertando desta forma ROS. Na malária, o que se observa, no que diz respeito ao stress oxidativo é um aumento do nível de peroxidação lipídica e diminuição do conteúdo em ácido ascórbico e glutatona redutase.

Assim, os antimaláricos referidos, são originadores do aumento dos níveis de lipoperoxidação, enquanto diminuem os níveis plasmáticos de antioxidantes, como a vitamina C, β -caroteno e GSH (Akanbi, 2011).

ii. Anti-epiléticos

O valproato, fármaco utilizado no tratamento da epilepsia, é particularmente útil no tratamento de certos tipos de epilepsia infantil, em que a sua baixa toxicidade e ausência de ação sedativa são especialmente importantes. É também comumente utilizado em adolescentes em que coexistem crises de pequeno e grande mal (Rang *et al.*, 2008).

No que concerne ao mecanismo de ação do valproato, ainda que seja um pouco desconhecido, sabe-se que ele atua aumentando significativamente o conteúdo de ácido gama-aminobutírico (GABA) do cérebro e é ainda um fraco inibidor de duas enzimas – GABA transaminase e semialdeído succínico desidrogenase – que são enzimas que

inativam o GABA. Além disso, sabe-se que também apresenta algum efeito sobre os canais de sódio (Rang *et al.*, 2008).

Também tem sido estudado o efeito de fármacos utilizados no tratamento da epilepsia e a sua relação com o stress oxidativo. Assim, Agarwal *et al.* (2011), verificaram que há evidências que o uso prolongado de antiepiléticos leva ao aumento de stress oxidativo. O ácido valpróico foi identificado como aumentando a peroxidação lipídica em pacientes que façam esta terapêutica. Além do valproato, a carbamazepina e levetiracetam também aumentam o stress oxidativo (Agarwal *et al.*, 2011).

Ainda no mesmo estudo, levado a cabo por Agarwal *et al.* (2011), ficou demonstrado que o tratamento com topiramato contribuiu para o aumento do stress oxidativo nos astrócitos de ratos. Ficou também provado que este fármaco, induziu a formação de ROS, a síntese de óxido nítrico, e a diminuição da atividade de glutamina sintetase e redução da viabilidade das células em culturas primárias de astrócitos de ratos.

iii. Anti-inflamatórios não esteróides

O diclofenac é um ácido fenilacético (Hickey *et al.*, 2001), e anti-inflamatório não esteróide (AINE), que tem propriedades anti-piréticas, analgésicas e anti-inflamatórias, apresentando uma potência moderada (Amin, 2005; Asensio *et al.*, 2007); Rang *et al.*, 2008), e, à semelhança de outros AINEs, é prescrito com alguma regularidade (Tripathi *et al.*, 2011). Hickey *et al.* (2001), corrobora essas propriedades e além disso, afirma que é usado na redução da dor associada a artrite e outras condições, como a osteoartrite, artrite reumatóide e espondilite anquilosante, e liga-se exclusivamente à albumina plasmática. Relativamente ao seu mecanismo de ação, admite-se que esteja relacionada com a ação primária dos fármacos, ou seja, à inibição da enzima ciclooxigenase (COX) de ácidos gordos, inibindo assim, a produção de prostaglandinas e tromboxanos (Asensio *et al.*, 2007; Rang *et al.*, 2008). É importante referir que existem três isoformas da enzima COX, sendo respetivamente a COX 1, COX 2 e COX 3, ainda que esta última ainda seja um pouco desconhecida, no que se refere à sua funcionalidade no ser humano. Assim, os AINEs, são inibidores tanto da isoforma COX1, como da COX2 (Lal *et al.*, 2009), porém, cada fármaco apresenta uma afinidade diferente para cada uma dessas isomorfias (Hickey *et al.*, 2001; Rang *et al.*, 2008). Assim, pensa-se que a

ação anti-inflamatória tem que ver com a inibição da COX 2 e os seus efeitos indesejáveis, têm que ver com a inibição da COX 1 (Asensio *et al.*, 2007; Lal *et al.*, 2009; Hickey *et al.*, 2001; Rang *et al.*, 2008), nomeadamente no que concerne à sua hepatotoxicidade (Tripathi *et al.*, 2011). Devido ao uso desta classe terapêutica, podem ocorrer efeitos colaterais, que tanto podem ser aumentos transitórios no valor sérico das transaminases, que pode ser indicativo de dano a nível hepatocelular ou colestase, que em último caso, pode levar a situação de hepatite fulminante fatal (Tripathi *et al.*, 2011).

Os processos inflamatórios e de dano tecidual, aumentam a proliferação celular, que pode resultar em crescimento descontrolado de células transformadas, como acontece em muitos tumores. Portanto, o uso de anti-inflamatórios não esteróides, como o ácido acetilsalicílico reduz a inflamação inibindo a síntese de prostaglandinas, que são sintetizadas por duas isoenzimas, a COX1 e a COX 2 – que é induzível (Raza, 2011). Há ainda que referir que os níveis de prostaglandina E2, encontram-se aumentados em estados inflamatórios e em tumores.

Todos os AINEs têm propriedades anti-piréticas, analgésicas e anti-inflamatórias, ainda que com ação diferencial. Contudo, o mecanismo molecular pelo qual os AINEs exercem a sua ação, têm múltiplos efeitos que ainda não são totalmente claros. Além da inibição do mecanismo do ácido araquidónico e da atividade da COX, outros mecanismos, incluindo alteração na transdução do sinal, disfunção mitocondrial e indução da apoptose são sugeridos (Raza, 2011).

O ácido acetilsalicílico induz a apoptose através da libertação do citocromo c da mitocôndria e outras vias dependentes da mitocôndria, incluindo a baixa regulação do gene de expressão Bcl-2 e NF- κ B e inibição das funções do proteossoma. Neste estudo em concreto, desenvolvido por Raza (2011), usaram-se células de hepatoma humano, que elucidaram o mecanismo de ação do ácido acetilsalicílico, depois do tratamento com 5 e 10 μ mol/ml de fármacos durante 24 e 48 horas. Os resultados obtidos, mostraram alteração na respiração mitocondrial, repressão do ciclo celular, e aumento do stress oxidativo. A depleção dos níveis de GSH e aumento da produção de ROS, foram acompanhadas por um aumento da lipoperoxidação, que, presumivelmente, desempenha um papel crítico no stress oxidativo induzido por disfunção mitocondrial e

apoptose (Raza, 2011). É também sugerido que o transporte de GSH na mitocôndria sob situações de stress oxidativo, pode ser regulado por proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2. Esta proteína desempenha um papel regulador, não apenas na iniciação da apoptose na mitocôndria, como também na regulação da homeostase da GSH neste organelo (Raza, 2011). Finalmente, no decorrer deste estudo, verificou-se que existiu uma redução da expressão do Bcl-2 e também uma depleção acentuada de GSH celular, depois do tratamento com ácido acetilsalicílico. Assim, é evidente concluir que este fármaco induz o aumento de stress oxidativo, levando à apoptose das células Hep2. Além disso, também se verifica stress oxidativo, dependente da mudança da permeabilidade mitocondrial, levando à perda de potencial de membrana (Raza, 2011).

À semelhança dos fármacos referidos anteriormente, o nimesulide, N-(4-nitro-2-phenoxifenil)metanosulfonamida, é um AINE com propriedades anti-inflamatórias, anti-piréticas e analgésicas e é um dos mais prescritos, comparativamente com outros da mesma classe terapêutica (Tripathi *et al.*, 2011). Relativamente ao nimesulide Tripathi *et al.* (2011), refere que a geração de ROS intracelular é determinante para a associação à toxicidade devido ao contacto com estes fármacos. Os efeitos adversos deste fármaco a nível mitocondrial prendem-se com o desacoplamento e com a oxidação do NADP(H), contudo, apesar de a mitocôndria ser o maior local de formação de ROS, ainda não está totalmente esclarecido a sequência de eventos de dano mitocondrial, bem como a relevância *in vivo* ainda não é totalmente clara (Tripathi *et al.*, 2011). Neste estudo, ficou bem claro que a formação de ROS está associada com lesão hepática *in vivo*, devido ao nimesulide. Além de a exposição a este fármaco causar alterações significativas nos níveis de antioxidantes, levando ao stress oxidativo, também causa uma rápida geração de ROS, bem como depleção de GSH, alteração em genes antioxidantes, despolarização massiva da membrana mitocondrial, levando à apoptose (Tripathi *et al.*, 2011).

No que respeita ao diclofenac e aos outros AINEs, anteriormente referido, é defendido que os seus efeitos tóxicos e apoptóticos, podem estar envolvidos em toxicidade renal e hepatotoxicidade (Hickey *et al.*, 2001) tanto em humanos, como em modelos animais (Amin, 2005). Deste modo, no estudo desenvolvido por Amin (2005), verificou-se que a hepatotoxicidade induzida em ratos pelo DDC foi associada com ROS e Hickey *et al.*

(2001), explica que a lesão hepática grave pode dever-se à sua bioativação, levando à formação de metabólitos reativos, conceito igualmente corroborado por Tripathi *et al.* (2011). Assim, relativamente a este fármaco, o observado foi que induz danos no fígado através de vários mecanismos como alteração da permeabilidade mitocondrial, ativação do citocromo P450 e finalmente, por geração de ROS (Amin, 2005). Hickey *et al.* (2001), afirma que o metabolismo do diclofenac mediado pelo citocromo P450, leva à formação de 5'-hidroxiclofenac e 4'-hidroxiclofenac. Nos humanos, o citocromo P450 2C9 e 3A4 metaboliza o diclofenac, embora o citocromo P450 2C9 seja capaz de produzir benzoquinoneimina. Apenas o derivado de 5'-hidroxiclofenac, o *p*-benzoquinoneimina, tem sido o primeiro suspeito de causar danos celulares, através da sua capacidade em estabelecer ligações covalentes com macromoléculas em situações onde os níveis intracelulares de NADH, NADPH, GSH e outros agentes redutores são bastante baixos (Hickey *et al.*, 2001). Contudo, apesar de faltarem algumas evidências sólidas, é bastante possível que o metabolismo do diclofenac através do citocromo P450 envolva a produção de ROS, como $O^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , H_2O_2 e NO^{\cdot} (Hickey *et al.*, 2001).

Além do referido anteriormente, no mesmo estudo, verificou-se que doses elevadas de diclofenac são responsáveis por uma grande ocorrência de degradação ordeira do DNA do rim em vinte e quatro horas, sendo que o efeito nefasto em função da dose e a morte celular programada é precedida de stress oxidativo (Hickey *et al.*, 2001).

Raza (2011), defende que parecem existir mecanismos moleculares comuns para as alterações metabólicas observadas na inflamação, cancro, diabetes e obesidade. Os mecanismos independentes da COX, proposto pelo mecanismo de ação dos AINEs, incluem alteração da respiração mitocondrial, aumento do stress oxidativo e aumento da regulação de proteínas pró-apoptóticas. A inibição da ativação do fator NF- κ B pela aspirina e por outros AINEs tem sido descrita em vários sistemas celulares, ainda que os hepatócitos pareçam ser insensíveis à inibição do NF- κ B (Raza, 2011). Asensio *et al.* (2007), refere que a indução da apoptose, por parte dos AINEs, provavelmente tem a sua origem na inibição da COX, especialmente a COX-2.

Assim, no decorrer do estudo desenvolvido por Raza (2011), os autores verificaram que existiu um aumento significativo de stress oxidativo e diminuição do potencial de

membrana mitocondrial, seguido por uma baixa regulação de Bcl-2, que pode ser a causa pela qual o ácido acetil-salicílico induz a apoptose. Além disso, também se observou que o fármaco em questão, leva a uma diminuição significativa dos níveis de ATP que são acompanhados pela inibição da atividade das enzimas que fazem parte da cadeia respiratória, nomeadamente NADH-ubiquinona oxidorreductase do complexo I e citocromo c oxidase, do complexo IV (Raza, 2011). Este facto adquire particular importância, uma vez que é defendido que a inibição, tanto *in vivo* como *in vitro*, de complexos respiratórios mitocondriais, é responsável pelo aumento da produção de ROS e de stress oxidativo mitocondrial (Raza, 2011).

iv. Anti-fúngicos

O cetoconazol é um fármaco anti-fúngico idêntico ao imidazol. Este fármaco é caracterizado como tendo um amplo espectro de atividade e boa disponibilidade oral, sendo bem absorvido pelo trato gastrointestinal (Amin, 2005; Rang *et al.*, 2008), o que contribui para aumentar fortemente as suas aplicações (Amin, 2005).

Este antifúngico, pertence à classe dos agentes anti-fúngicos sintéticos e a sua atividade baseia-se no seu núcleo imidazol. O mecanismo de ação desta classe terapêutica baseia-se na capacidade que têm para inibir a enzima fúngica 3 do citocromo P450, que se denomina por lanosina 14 α -desmetilase, que é a enzima responsável por permitir a conversão do lanosterol em ergosterol, que é o principal esteroide da membrana celular dos fungos. Assim, vai haver uma consequente alteração da fluidez da membrana, que vai interferir com a ação das enzimas de membrana (Rang *et al.*, 2008).

Em relação ao cetoconazol, Amin (2005), refere que além da hepatotoxicidade, foi também observada uma extensa fragmentação no DNA, bem como peroxidação lipídica, como uma consequência direta do stress oxidativo, dado ter-se verificado uma diminuição da atividade de enzima glutatona redutase e superóxido dismutase no fígado. Tal facto, também é contemplado no que concerne ao diclofenac e ao DDC.

v. Dietilditiocarbamato de sódio (DDC)

DDC é um composto ditiocarbamato que é largamente utilizado na indústria e agricultura, porém, é também usado na medicina, pois é considerado um agente protetor

da radiação, bem como em imunoterapia no cancro da mama. Além disso, tem também levantado interesse, no âmbito do tratamento da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), devido à sua ação imunomoduladora e atividade antiviral contra o vírus da SIDA (Amin, 2005).

Considerando o estudo desenvolvido por Amin (2005), constata-se que os tiocarbamatos induzem a apoptose, por mediação pela via de ativação da caspase-3, diminuindo o potencial de membrana mitocondrial, aumentando a produção de radicais livres e esgotando a glutathione reduzida. Devido à sua aptidão para formar complexos lipofílicos, o DDC pode atravessar facilmente as membranas celulares, aumentando os níveis de cobre intracelular, destruindo assim a homeostase intracelular de cobre. Este aumento, pode levar ao acontecimento de stress oxidativo, devido à produção de radicais livres e pode ainda interferir com as reações enzimáticas dependentes de cobre, como por exemplo, a superóxido dismutase (Amin, 2005).

Relativamente à fragmentação do DNA, o estudo mostrou que DDC mostrou ter efeitos na fragmentação de DNA nos timócitos de ratos, à semelhança do diclofenac que também induz apoptose e fragmentação de DNA em rins de ratinhos e hepatócitos de ratos. A hepatotoxicidade do cetoconazol deve-se à sua capacidade de depleção de glutathione redutase hepática, que indica uma crucial associação entre a geração de ROS e o dano oxidativo nas membranas lipídicas e no DNA (Amin, 2005).

O stress oxidativo e a inflamação resultam em danos teciduais e são características de doenças crónicas, como a diabetes. Nestes casos, observa-se um aumento da produção e uma eliminação ineficiente de ROS, produtos avançados da oxidação de proteínas e acumulação de produtos de glicosilação avançada, que têm um papel decisivo nesta patologia (Chakraborty, 2011). Contudo, e a título de exemplo, existem fármacos que têm um papel inverso ao que tem sido estudado, ou seja, que exercem um efeito benéfico no que concerne à formação de ROS. Então, no estudo desenvolvido por, Chakraborty (2011), verificou-se que foram identificadas um grande número de desordens relacionadas com ROS, aquando da iniciação e progressão da diabetes tipo II, pois verificou-se a geração destas espécies no sistema intracelular. Ainda no mesmo estudo, constatou-se que após vinte e quatro semanas de administração de metformina

aos pacientes, houve uma redução significativa da produção de espécies reativas nos glóbulos brancos. Tal facto indica que este fármaco exerce efeitos ao nível da diminuição do stress oxidativo em pacientes diabéticos com esta terapia (Chakraborty, 2011; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003). Bonnefont-Rousselot *et al.* (2003), considera que isso pode dever-se à característica deste fármaco em limitar a formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) e ainda à capacidade de diminuir o excesso de produção de radicais livres em pacientes diabéticos. Assim, neste estudo, em que o objetivo foi pesquisar a capacidade que a metformina, *in vitro*, tem em modular a ação das ROS, constatou-se que este fármaco, em concentrações farmacologicamente relevantes, *in vitro*, foi capaz de eliminar o radical hidroxilo, mas não o radical superóxido.

XIII. Conclusões

A cronicidade do processo de stress oxidativo tem implicações importantes sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, como por exemplo, a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e cancro.

A instalação do stress oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e oxidantes, em favor dos primeiros. O sistema de defesa antioxidante, tem como objetivo principal manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem sobretudo nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma.

Existem evidências de que os fatores exógenos, como xenobióticos, fármacos, radiações ionizantes, metais pesados, tabagismo, ingestão de álcool agem sobre a geração de radicais livres, bem como sobre a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, ainda não é possível determinar com segurança, sobretudo em humanos, os níveis de exposição que seriam potencialmente nocivos.

A célula deve responder a condições de stress por deficiência ou excesso de aporte energético, para controlar processos de morte celular, envelhecimento e senescência. Contudo, mesmo na presença de mecanismos potentes de defesa antioxidante dentro das células, muitas vezes, estes mecanismos podem ser superados pelos fatores oxidantes, resultando em lesões teciduais, por meio da peroxidação das membranas lipídicas de células, organelos, a desnaturação funcional de proteínas estruturais, lesões mutagênicas dos ácidos nucleicos e a desnaturação de componentes polissacarídeos de componentes do interstício de membranas basais. Consequentemente, esta toxicidade local dos radicais livres e outros produtos tóxicos do oxigênio constituem a via comum final da lesão tecidual numa variedade de doenças.

O uso de fármacos, é cada vez mais encarado como um ato que apenas traz benefícios ao paciente. Porém, apesar do consumo generalizado e acesso fácil a muitos fármacos, é preciso considerar que alguns deles têm não só os efeitos benéficos pretendidos, como também têm a capacidade de induzir alterações e danos celulares, que podem ser

irreversíveis, nomeadamente devido ao efeito que têm na indução de stress oxidativo. Tal como foi desenvolvido durante o trabalho, algumas das classes terapêuticas mais frequentemente prescritas e utilizadas são causadoras desse mesmo dano, pelo que deve ser sempre considerado o seu real benefício.

XIV. Referências Bibliográficas

Agarwal, N.B., Argwal, N.K., Mediratta, P.K., Sharma, K.K. (2011). Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. *Seizure*, 20, pp. 257-262.

Akanbi, O.M., Odaibo, A.B., Ademowo, O.G. (2010). Effect of Antimalarial Grugs and Malaria Infection on Oxidative Stress in Pregnant Women. *African Journal of Reproductive Health*, 14(3), pp. 209-212.

Amin, A., Hamza, A.A. (2005). Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: a possible role of DNA fragmentation. *Toxicology*, 208, pp. 367-375.

Asensio, C., Levoine, N., Guillaume, C., Guerquin, M-J., Rouguieg, K., Chrétien, F., Chapleur, Y., Netter, P., Minn, A., Lapique, F. (2007). Irreversible inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by the coenzyme A conjugate of Ketoprofen: A key to oxidative stress induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs?. *Biochemical Pharmacology*, 73, pp. 405-416.

Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.C.G., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J. (2010). Oxidative Stress: Concept, implications and modulating factors. *Journal of Nutrition*, 23(4), pp. 629-543.

Bonnefont-Rousselot, D., Raji, B., Walrand, S., Gardès-Albert, M., Jore, D., Legrand, A., Peynet, J., Vasson, M.P. (2003). An Intracellular Modulation of Free Radical Production Could Contribute to the Beneficial Effects of Metformin Towards Oxidative Stress. *Metabolism*, 52(5), pp. 586-589.

Bussuan, L.A.M., Fagundes, D.J., Marks, G., Bussuan, P.M., Teruya, R. (2010). The role of Faz ligand protein in the oxidative stress induced by azoxymethane on crypt of rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 25(6), pp. 501-506.

Chakraborty, A., Chowdhury, S., Bhattacharyya, M. (2011). Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93, pp. 56-62.

Chelikani, P., Fita, I., Loewer, P.C. (2004). Diversity of structures and proprieties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, pp. 192-208.

Choi, J. (2012). Oxidative stress, endogenous antioxidants, alcohol, and hepatitis C: pathogenic interactions and therapeutic considerations. *Free Radical Biology & Medicine*, 52, pp. 1135-1150.

da Cunha, A.P., Roque, O.R. (2005). Estudo dos principais constituintes de natureza fenólica, provenientes da via ácido siquímico e da via acetato. *In: da Cunha, A.P. (Ed.). Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 209-336.

da Cunha, A.P., Roque, O.R. (2005). Terpenóides e esteróides. *In: da Cunha, A.P. (Ed.). Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 337-482.

Di Giulio, R.T. and Newman, M.C. (2008). Ecotoxicology. *In: Klaassen, C.D. Toxicology. The Basic Science of Poisons*. 7thed. New York, Mc Graw-Hill, pp. 1157-1188.

Eaton, D.L. & Gilbert, S.G. (2008). General Principles of Toxicology. *In: Klaassen, C.D. Toxicology. The Basic Science of Poisons*. 7thed. New York, Mc Graw-Hill, pp. 11-14.

Echeverri-Ruíz, N.P. e Mockus-Sivickas, I. (2010). Mecanismos Celulares en Respuesta al Estrés: Sirtuinas. *Rev.Fac.Med.*, 58(3), pp. 221-232.

Frustaci, A., Neri, M., Cesario, A., Adams, J.B., Domenici, E., Bernardina, B.D., Bonassi, S. (2012). Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses. *Free Radical Biology and Medicine*, 52, pp. 2128-2141.

Gill, S.S., Khan, N.A., Tuteja, N. (2012). Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it um regulates sulfur assimilation and antioxidante machinery in garden cress (*Lepidium sativum L.*). *Plant Science*, 182, pp. 112-120.

Gregus, Z. (2008). Mechanisms of Toxicity. *In: Klaassen, C.D. Toxicology. The Basic Science of Poisons*. 7thed. New York, Mc Graw-Hill, pp. 45-106.

Hickey, E.J., Raje, R.R., Reid, V.E., Gross, S.M., Ray, S.D. (2001). Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(2), pp. 139-152.

Huang, C-F., Liu, S-H., Lin-Shiau, S-Y. (2012). Pyrrolidine dithiocarbamate augments Hg²⁺-mediated induction of macrophage cell death via oxidative stress-induced apoptosis and necrosis signaling pathways. *Toxicology Letters*, 214, pp.33-45.

Huk, O., Catelas, I., Mwale, F., Antoniow, J., Zukar, D.J., Petit, A. (2004). Introduction of Apoptosis and Necrosis by Metal Ions *In Vitro*. *The Journal of Arthroplasty*, 19(8), pp. 84-88.

Kim, K.B., Lee, B.M. (1997), oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Letters*, 113, pp. 205-212.

Kumar, S., Srivastava, N., Gomes, J. (2011). The effect of lavastatin on oxidative stress and antioxidant enzymes in hydrogen peroxide intoxicated rat. *Food and Chemical Toxicology*, 49, pp. 898-902.

Lal, N., Kumar, J., Erdahl, W.E., Pfeiffer, D.R., Gadd, M.E., Graff, G., Yanni, J.M. (2009). Differential effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on mitochondrial dysfunction during oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 490, pp. 1-8.

Leonard, B., Maes, M. (2012). Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and contaminants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, pp. 764-785.

Lushchak, V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, pp. 13-30.

Maes, M., Galecki, P., Chang, Y.S., Berk, M. (2011). A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35, pp. 676 – 692.

Mayes, P.A. (2000). Structure and function of lipid-solute vitamins. *In: Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (Eds). Biochemistry. (25th ed). United States of America, Appleton & Lange, pp. 642- 652.*

McKee, T. (1999). Oxidative stress. *In: McKee, T. & McKee, J.R. (Eds). Biochemistry: An Introduction. (2nd ed). United States of America. McGraw – Hill, pp. 316-329.*

Milatovic, D., Gupta, R.C., Yu, Y., Zaja-Milatovic, S., Aschner, M. (2011). Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256, pp. 219-226.

Milusheva, E., Mária, B., Eszter, K., Zsuzsanna, H., Vizi, E.S., Sperlágh, B. (2010). The effect of antiparkinsonian drugs on oxidative stress induced pathological [H]dopamine efflux after *in vitro* rotenone exposure in rat striatal slices. *Neuropharmacology*, 58, pp. 816-825.

Nicholls, P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525, pp. 95-101.

Oliveira, M.C. e Schoffen, J.P.F. (2010). Oxidative Stress Action in Cellular Aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology. An International Journal*, 53(6), pp. 1333-1342.

Pandey, K.B. & Rizvi, S.I. (2010). Resveratrol May Protect Plasma Proteins from Oxidation under Conditions of Oxidative Stress *In Vitro*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 21(5), pp. 909-913.

- Patel, D.K., Kumar, R., Laloo, D., Hemalatha, S. (2012). Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, pp. 411-420.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (2008). Fármacos Usados no Tratamento das Infecções e do Câncer. *In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (Eds). Rang & Dale Farmacologia. (6th ed). Rio de Janeiro, ELSEVIER, pp. 645-736.*
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (2008). Mediadores Químicos. *In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (Eds). Rang & Dale Farmacologia. (6th ed). Rio de Janeiro, ELSEVIER, pp. 129-274.*
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (2008). O Sistema Nervoso. *In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (Eds). Rang & Dale Farmacologia. (6th ed). Rio de Janeiro, ELSEVIER, pp. 271-644.*
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (2008). Tópicos Essenciais. *In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (Eds). Rang & Dale Farmacologia. (6th ed). Rio de Janeiro, ELSEVIER, pp. 739-781.*
- Raza, H., John, A., Benedict, S. (2011). Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma, HepG2 cells. *European Journal of Pharmacology*, 668, pp. 15-24.
- Regateiro, F.J. (2005). Genes de Regulação da Proliferação celular. Apoptose. Senescência. *In: Regateiro, F.J. (Ed). Manual de Genética Médica. (1^a ed). Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra, pp. 351-375.*
- Ryan, M.J., Dudash, H.J., Docherty, M., Geronilla, K.B., Baker, B.A., Half, G.G., Cutlip, R.G., Always, S.E. (2010). Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Experimental Gerontology*, 45, pp. 882-895.

Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, P. (2003). Organização do Corpo Humano. *In*: Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, P. (Eds). *Anatomia & Fisiologia*. (6th ed). Loures, LUSOCIÊNCIA, pp. 1-99.

Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, P. (2003). Regulação e Manutenção. *In*: Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, P. (Eds). *Anatomia & Fisiologia*. (6th ed). Loures, LUSOCIÊNCIA, pp. 651-999.

Sonta, T., Inoguchi, T., Tsubouchi, H., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Matsumoto, S., Utsumi, H., Nawata, H. (2004). Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(1), pp. 115-123.

Tacchini, L., Fusar-Poli, D., Bernelli-Zazzera, A. (2002). Activation of transcription factors by drugs inducing oxidative stress in rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 63, pp. 139-148.

Tafazoli, S., O'Brien, P.J. (2009). Amodiaquine-induced oxidative stress in a hepatocyte inflammation model. *Toxicology*, 256, pp. 101-109.

Tripathi, M., Singh, B.K., Sheikh, R., Poonam, K. (2011). Abrogation of nimesulide induced oxidative stress and mitochondria mediated apoptosis by *Fumaria parviflora* Lam. extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 136, pp. 94-102.

Vairetti, M., Ferrigno, A., Bertone, R., Richelui, P., Bertè, F., Freitas, I. (2005). Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740, pp. 367-374.

Valentine, J.S. (2007). Dioxygen Reactivity and Toxicity. *In*: Bertini, I., Gray, H.B., Stiefel, E.I., Valentine, J.S. (Eds). *Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity*. California, University Science Books, pp. 319-331.

Vannucchi, H., Moreira, E.A.M., da Cunha, D.F., Junqueira-Franco, M.V.M., Bernardes, M.M., Jordão-Jr, A.A. (1998). PAPEL DOS NUTRIENTES NA

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.
Simpósio: NUTRIÇÃO CLÍNICA, 31, pp. 31-44.

Volp, A.C.P., Bressan, J., Hermsdorff, H.H.M., Zulet, M.A., Martínez, J.A. (2010).
Efeitos antioxidantes do selênio e seu elo com a inflamação e síndrome metabólica.
Revista de Nutrição, 23(4), pp. 581-590.

Weston, R.J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the
antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71, pp. 235-239.

Wink, D.A., Miranda, K.M., Espey, M.G. (2000). Effects of Oxidative and Nitrosative
Stress in Cytotoxicity. *Seminars in Perinatology*, 24(1), pp. 20-23.