

26 Nov
16h00

S.151

Carlos Manuel Pombo Martins Mourão

Prof. Aires
dos Coelhos

Enzimas antioxidantes e patologias neurodegenerativas:
estado da arte

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Carlos Manuel Pombo Martins Mourão

Enzimas antioxidantes e patologias neurodegenerativas:
estado da arte

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

III

Enzimas antioxidantes e patologias neurodegenerativas:
estado da arte

Universidade Fernando Pessoa

Dissertação apresentada à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Carlos Manuel Pombo Martins Mourão

(Carlos Manuel Pombo Martins Mourão)

Errata

Errata referente à dissertação de Mestrado intitulada “**Enzimas antioxidantes e patologias neurodegenerativas: estado da arte**”, realizada por Carlos Mourão:

Pagina	Onde se lê	Deve ler
7	<ul style="list-style-type: none">• Oxidorredutases – as desidrogenases e oxidases catalisam reações de transferência de eletrões, ou seja, reações de oxirredução;• Transferases – As quinases e as transaminases, por exemplo, catalisam reações de transferência de grupos funcionais, como grupos amina, fosfato, carboxil, etc.;• Hidrolases – as peptidases, por exemplo, catalisam reações de hidrólise de ligações covalentes; as liases catalisam quebras de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amónia e gás carbónico;• Isomerasas – catalisam reações de interconversão entre isómeros ótimos ou geométricos. As epimerases são exemplos;• Ligases – catalisam reações de formação e novas moléculas a partir da ligação de duas já existentes, sempre à custa de energia (ATP). As sintases são um exemplo.	<ul style="list-style-type: none">• Oxidorredutases – as desidrogenases e oxidases catalisam reações de transferência de eletrões, ou seja, reações de oxirredução;• Transferases – As quinases e as transaminases, por exemplo, catalisam reações de transferência de grupos funcionais, como grupos amina, fosfato, carboxil, etc.;• Hidrolases – as peptidases, por exemplo, catalisam reações de hidrólise de ligações covalentes;• Liasas- catalisam quebras de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amónia e gás carbónico;• Isomerasas – catalisam reações de interconversão entre isómeros ótimos ou geométricos. As epimerases são exemplos;• Ligases – catalisam reações de formação e novas moléculas a partir da ligação de duas já existentes, sempre à custa de energia (ATP). As sintases são um exemplo.

Pagina	Onde se lê	Deve ler
14	<p>Atualmente existe no mercado uma ampla variedade de medicamentos à base de enzimas para aplicação como anti-inflamatórios, antissépticos, auxiliares digestivos, na reposição de enzimas hemostáticas, na inibição da coagulação, na reposição de enzimas metabólicas, no tratamento da fibrose cística bem como na terapia contra o cancro (Cruz <i>et al.</i>, 2008; Zimmer <i>et al.</i>, 2009). No mercado existe, atualmente, uma ampla variedade de medicamentos com base enzimática, para aplicação como auxiliares digestivos, anti-inflamatórios, anti-sépticos, na reposição de enzimas hemostáticas, na inibição da coagulação, na prevenção de lesões de reperfusão, no tratamento da icterícia neonatal, no tratamento da fibrose cística, na reposição de enzimas metabólicas e na terapia do cancro (Cruz <i>et al.</i>, 2008).</p>	<p>Atualmente existe no mercado uma ampla variedade de medicamentos à base de enzimas para aplicação como anti-inflamatórios, antissépticos, auxiliares digestivos, na reposição de enzimas hemostáticas, na inibição da coagulação, na reposição de enzimas metabólicas, no tratamento da fibrose cística bem como na terapia contra o cancro (Cruz <i>et al.</i>, 2008; Zimmer <i>et al.</i>, 2009).</p>

Resumo

A literatura apresenta uma evidência crescente de que o stress oxidativo promovido pelas espécies oxigénio-reativas (ROS) pode ter um papel vital na etiologia das doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson ou a esquizofrenia, entre outras. As ROS possuem um papel duplo, tanto benéfico quanto prejudicial, no organismo humano. Estas são geralmente reguladas por enzimas antioxidantes endógenas para que o balanço oxidativo seja mantido mas, por factores endógenos e exógenos, pode ocorrer uma alteração com produção excessiva que resulta em stress oxidativo. Este stress oxidativo constante promove danos nos componentes celulares, como nas proteínas, nos lípidos ou nas bases do ADN.

O mecanismo de oxidação é particularmente importante no cérebro, uma vez que este está exposto a grandes quantidades de oxigénio, promotor do aparecimento de radicais livres e de ROS. O mecanismo adaptativo de defesa antioxidante apresenta, também ele, uma importância acrescida neste órgão na tentativa de evitar que os componentes cerebrais sejam afetados e, conseqüentemente, o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Este trabalho pretende permitir um melhor conhecimento sobre a natureza bioquímica das ROS, as fontes dos radicais livres, o dano proteico, lipídico e no ADN promovido por estes, o papel das enzimas antioxidantes endógenas na regulação das funções fisiológicas e a implicação do stress oxidativo na etiologia das doenças neurodegenerativas. Para tal foi realizada uma revisão bibliográfica da literatura existente sobre o tema.

Palavras-chave: “*endogenous enzymes*”, “ROS”, “*neurodegenerative diseases*”
“*neuropatology diseases and enzymes*”.

Abstract

The evidence in the literature that the oxidative stress promoted by reactive oxygen species have a vital role in the etiology of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and schizophrenia, among other, is growing. ROS are generally governed by endogenous antioxidant enzymes to maintain the oxidative balance in the organism but, because endogenous or exogenous oxidative factors may occur, this balance can be corrupted and lead to oxidative stress. Constant oxidative stress can result in damage in the cellular components such as proteins, lipids or DNA bases.

The oxidation mechanism is particularly important in the brain since it is exposed to large quantities of oxygen promoting the appearance of free radicals and ROS. The adaptive antioxidant defense mechanism is also important in this organ in the attempt to prevent the components of the brain from being affected and then developing neurodegenerative diseases.

This paper aims to provide a better understanding of the biochemical nature of ROS, the sources of free radicals, damage protein, lipid and DNA promoted by these, the role of endogenous antioxidant enzymes in the regulation of physiological functions and the involvement of oxidative stress in the etiology neurodegenerative diseases. For this we conducted a literature review of the existing literature on the subject.

Key-words: "*endogenous enzymes*", "*ROS*", "*neurodegenerative diseases*" "*neuropatology diseases and enzymes*".

Dedicatória

À minha família, que sempre me apoiou e acreditou em mim.

Agradecimentos

... à minha orientadora, a Prof. Dra. Maria João Coelho pela paciência, apoio e prontidão que sempre disponibilizou no decorrer esta jornada.

... a todos os docentes, amigos e colegas que vivenciaram comigo esta experiência única, em especial ao Ricardo e ao Pedro por partilharem comigo muitas aventuras e desventuras durante este percurso, e ao Litos e à Amélie por serem o meu suporte fora da vida universitária, o meu obrigado.

... um agradecimento especial para J. pelo incansável apoio que me deu.

... a todos os que se cruzaram comigo nesta viagem e deixaram a sua marca, uma pegada nesta estrada que percorro, os meus sinceros agradecimentos.

“Faça o que puder, com o que se tem, onde estiver”

- (Theodore Roosevelt)

Índice Geral

Resumo.....	V
<i>Abstract</i>	VI
Dedicatória	VII
Agradecimentos.....	VIII
Índice Geral.....	X
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas.....	XII
Índice de abreviaturas e símbolos	XIII
Capítulo I – Introdução	01
Capítulo II – Desenvolvimento	04
1. Estado da arte sobre as enzimas	04
1.1. Histórico enzimático.....	04
1.2. Definição de enzima	06
1.3. Classificação e estrutura	07
1.4. Especificidade enzimática	08
1.5. Efeito da temperatura e do pH.....	09
1.6. Mecanismos de ação enzimática.....	10
1.7. Instabilidade e estabilidade enzimática	11
1.8. Funções biológicas enzimáticas e a sua utilização	12
1.8.1. Enzimas de uso terapêutico	12
1.8.2. Enzimas e a indústria alimentar.....	14
2. Sistema de defesa: enzimas antioxidantes.....	16
2.1. Radicais livres e ROS	16
2.2. Defesa e enzimas antioxidantes	24

2.2.1. <i>Superóxido dismutase</i> (SOD).....	28
2.2.2. <i>Catalase</i> (CAT).....	29
2.2.3. <i>Glutathione peroxidase</i> (GPx).....	30
2.2.4. <i>Glutathione reductase</i> (GR)	31
2.2.5. <i>Glutathione S-transferase</i> (GST).....	31
2.3. Danos oxidantes no corpo humano	32
3. Patologias neurodegenerativas e enzimas antioxidantes	34
3.1. Cérebro, neurónios e stress oxidativo	34
3.2. Patologias neurodegenerativas.....	37
3.2.1. Doença de Alzheimer.....	37
3.2.2. Doença de Parkinson.....	41
3.2.3. Esquizofrenia	43
3.2.4. Esclerose lateral amiotrófica ou doença do neurónio motor	45
3.2.5. Esclerose múltipla	46
Capítulo III – Conclusão	49
Capítulo IV – Referências bibliográficas.....	51

Índice de Figuras

Figura 1 – Jöns Jacob Berzelius (1779-1848), Louis Pasteur (1822-1895) e Justus von Liebig (1803-1873)	05
Figura 2 – Modelo de ação enzimático	09
Figura 3 – Formação do radical superóxido com a catalisação do O ₂ pela NADPH oxidase	19
Figura 4 – Classificação dos antioxidantes	20
Figura 5 – Fontes exógenas e endógenas das ROS	21
Figura 6 – Balanço oxidativo vs stress oxidativo	22
Figura 7 – O ₂ nas células.....	23
Figura 8 - Esquema das reações e respetivas enzimas (azul) envolvidas na formação de ROS	27
Figura 9 – Comparação entre um cérebro normal e de um paciente com doença de Alzheimer	39
Figura 10 – Observação da matéria negra de um cérebro pertencente a um paciente com doença de Parkinson.....	42
Figura 11 – Alterações no cérebro com esquizofrenia.....	44
Figura 12 – Expressão das enzimas antioxidantes na proteção da patogénese da EM.....	48

Índice de Tabelas

Tabela I – Caracterização das principais ROS formadas <i>in vivo</i>	18
Tabela II – Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos	24
Tabela III – Principais enzimas antioxidantes que catalisam a eliminação de ROS	25

Índice de abreviaturas e símbolos

A

- ADN – ácido desoxirribonucleico
- ARE – elementos de resposta antioxidante
- ATP – Adenosina Trifosfato

C

- °C – Centígrados
- CAT - Catalase

E

- *E. carotovora* – *Escherichia carotovora*
- *E. coli* - *Escherichia coli*
- EAE – allergic encephomyelitis
- ES – enzima-substrato

G

- GSH – Glutathionas

H

- H₂O – água

I

- IUB – *International Union of Bioquimics*

K

- Kcal – quilocaloria
- Keap1 – *actin-bound Kelch-like ECH-associated protein 1*

N

- NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
- Nrf2 – fator nuclear fator-E2-relacionado

O

- H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

- O₂ – Oxigénio
- O² - Superóxido
- OH – Hidroxilo

P

- P – Produto da reação
- PD- Parkinson's disease
- PUFA – ácidos gordos polinsaturados

R

- ROO- - Peróxido
- ROS – espécies oxigénio-reativas

S

- SOD – superóxido dismutase
- SNC – sistema nervoso central

V

- VIH – vírus da imunodeficiência adquirida

Capítulo I – Introdução

A existência de espécies químicas na forma de radicais livres foi primeiramente descrita no decorrer do ano de 1900, quando a decomposição do hexafeniletano em dois radicais fenilmetil foi demonstrada. Entretanto, as reações no meio biológico envolvendo radicais livres foram consideradas de extrema importância após 1940, com a introdução de técnicas que permitiram a detecção dos radicais livres e o estudo da cinética das reações das espécies químicas. A evolução do conhecimento sobre as espécies oxigénio-reativas foi gradual, iniciando-se com a identificação de enzimas cujos substratos eram radicais livres, progredindo para a identificação das suas vias metabólicas, para a detecção do seu efeito nas células e nos tecidos e, por fim, para a associação do envolvimento dos radicais livres em algumas das condições patológicas conhecidas (Ribeiro *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

As ROS abrangem todas as formas reativas ao oxigénio, incluindo radicais e não radicais, que participam na iniciação e progressão de reações em cadeia. Estes processos oxidativos celulares são críticos para a vida aeróbia mas, ao mesmo tempo, o produto das ROS é tóxico e contribui para o aparecimento de diversas patologias se houver uma falha no balanço oxidativo (Cerqueira *et al.*, 2007). O stress oxidativo resulta da presença em excesso de moléculas pró-oxidantes, em desfavor das antioxidantes, manifestando-se de diversas formas e afectando através do dano oxidativo as bases do DNA e as funções lipoproteicas (Balamaran, 2013; Behl e Moosmann, 2002).

O stress oxidativo tem uma dualidade de funções, ativando positivamente uma resposta específica do mecanismo adaptativo desenvolvido para proteger as células contra as ROS, mediando a toxicidade e mantendo o balanço redox do tecido. Simultaneamente, esta resposta requer o aumento da expressão proteica e das enzimas antioxidantes endógenas (Cerqueira *et al.*, 2007; Schrag *et al.*, 2013; Zimmer *et al.*, 2009). A cinética enzimática qualitativa e quantitativa mostra que as enzimas se comportam de forma mais previsível em sistemas ideais simples, como os utilizados para classificar e caracterizar as preparações enzimáticas. Trabalham de forma máxima em valores específicos de pH, temperaturas e concentrações de substrato. Em concentrações de

substrato fixo, as taxas de reação enzimática dependem da concentração da enzima, dependendo da eficiência do volume enzimático específico (Food Brasil, 2011).

O cérebro é particularmente susceptível ao dano oxidativo uma vez que utiliza grande parte do oxigénio inspirado, já que as membranas celulares são particularmente ricas em lípidos e existe pouca catalase na substância cinzenta e branca e quantidades moderadas de glutathione peroxidase e glutathione reductase. Patologias como a doença de Alzheimer, a esquizofrenia, a esclerose lateral amiotrófica, a doença de Parkinson, a esclerose múltipla e outras doenças degenerativas dos gânglios da base, atrofia sistémica múltipla e degeneração supranuclear progressiva, são teorizadas como sendo mediadas pelas ROS e que o stress oxidativo parece estar intimamente ligado ao despoletar destas (Pôrto, 2001).

A presente revisão bibliográfica tem como objetivo principal discorrer sobre o estado da arte do papel do stress oxidativo no aparecimento de patologias neurodegenerativas, com a elaboração de subtemas como:

- o que são as enzimas e o seu papel;
- identificação do estado da arte na literatura sobre as enzimas antioxidantes, principalmente as endógenas;
- etiologia das doenças neurodegenerativas e ação do stress oxidativo;
- clarificação sobre o papel das enzimas antioxidantes endógenas em algumas patologias neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esquizofrenia, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla;

Para tal, a metodologia empregue iniciou-se com uma pesquisa bibliográfica na literatura existente sobre este tema, disponível em acesso livre, tendo sido utilizadas publicações científicas obtidas electronicamente. Os artigos encontram-se disponíveis na base de dados bibliográficos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e limitam-se às línguas portuguesa e inglesa, e foram obtidos através dos motores de busca *Pubmed*, *Scielo* e *Sciencedirect*, com as seguintes palavras-chave: “*endogenous enzymes*”, “*ROS*”, “*neurodegenerative diseases*” e uma combinação entre

diferentes palavras-chave como “*neuropatology diseases and enzymes*”, com restrições temporais entre o ano de 2000 e 2013.

Após a leitura dos resumos de cada artigo, foram aplicados os seguintes critérios de inclusão: a) similaridade entre o tema deste trabalho e o título dos artigos; b) datarem entre 2000 e 2013; c) número de palavras-chave em comum.

Capítulo II - Desenvolvimento

1. Estado da arte sobre as enzimas

1.1. Histórico enzimático

A altura exata em que estas moléculas começaram a ser utilizadas nas atividades quotidianas das sociedades não se encontra totalmente esclarecida, mas sabe-se que o conhecimento era empírico, ou seja, não havia um conhecimento pormenorizado do seu conceito e da sua função (Zimmer *et al.*, 2009).

No século XVIII, o cientista italiano Spallanzini estudou a ação digestiva das secreções estomacais sobre a carne sem, no entanto, conseguir identificar a molécula envolvida. A identificação da amilase só viria a acontecer em 1833, num trabalho desenvolvido pelos franceses Anselme Payen e Jean-François Persoz (Food Brasil, 2011; Mira, 2013; Zimmer *et al.*, 2009).

Num breve resumo cronológico, em 1831, o químico sueco Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) constatou que certas substâncias continham uma força catalítica que lhes permitia acelerar determinadas reações e, dois anos mais tarde, os químicos franceses Anselme Payen (1795-1871) e Jean-François Persoz (1805-1868) encontraram uma substância termolábil no precipitado do álcool, onde o extrato de malte tinha a capacidade de converter o amido em açúcar. Pouco depois, Berzelius publicou a sua primeira teoria sobre as enzimas, decorria o ano de 1835 (Zimmer *et al.*, 2009). No entanto, foi o químico francês Louis Pasteur (1822-1895) o primeiro a concluir que a fermentação era catalisada por “fermentos” (enzimas), postulando que “estes fermentos eram inseparáveis das estruturas das células vivas do lêvedo e a fermentação alcoólica um ato correlacionado à vida e à organização das células do fermento e não à sua morte ou putrefação”, estabelecendo o conceito de que as enzimas seriam organismos vivos (Mira, 2013; Zimmer *et al.*, 2009). Somente em 1878 foi esclarecida a distinção entre os organismos inteiros e as moléculas capazes de realizar a catálise, passando a denominar-se pelo termo cunhado por Alexander Friedrich Khune, enzimas, do Grego “no fungo”, e a ação destas moléculas chamada de fermentação (Mira, 2013; Zimmer *et al.*, 2009).

Em 1898, Pierre Émile Duclaux (1840-1904), diretor do Instituto Pasteur, estabeleceu a designação das enzimas pelo nome do substrato no qual a sua ação foi primeiramente observada, seguida pelo sufixo – ase (Mira, 2013). No fim desse século, Eduardo Buchner (1860-1917) provou que as enzimas permaneciam ativas no exterior das células que as produziam, demonstrando que a ação enzimática seria independente das mesmas, o que lhe valeu o prêmio Nobel da Química de 1907. Todavia, passado um quarto do século XX, a natureza destas permanecia desconhecida, até que em 1926 o bioquímico James Batcheller Sumner (1887-1955), da *Cornell University*, isolou e cristalizou a urease, demonstrando que os cristais desta consistiam inteiramente em proteínas. A descoberta postulou que todas as enzimas são proteínas, embora esta ideia tivesse permanecido controversa por algum tempo. James Sumner ganhou o prêmio Nobel da Química em 1946, com John Howard Northrop (1891-1987) e Wendell Meredith Stanley (1904-1971), norte-americanos professores/pesquisadores no *Rockefeller Institute for Medical Research*, após a confirmação desta teoria. Entre 1930 e 1936, John Northrop e os seus colegas cristalizaram a pepsina, a quimotripsina e a tripsina bovina, estabelecendo totalmente na comunidade científica a natureza proteica das mesmas (Mira, 2013). O biólogo e geneticista inglês John Burdon Sanderson Haldane (1892-1964) descreveu também ele, em 1930, num tratado intitulado *Enzymes*, a notável sugestão de que as interações por ligações fracas entre a enzima e o substrato poderiam ser utilizadas para distorcer a molécula do substrato e catalisar uma reação (Food Brasil, 2011; Mira, 2013).

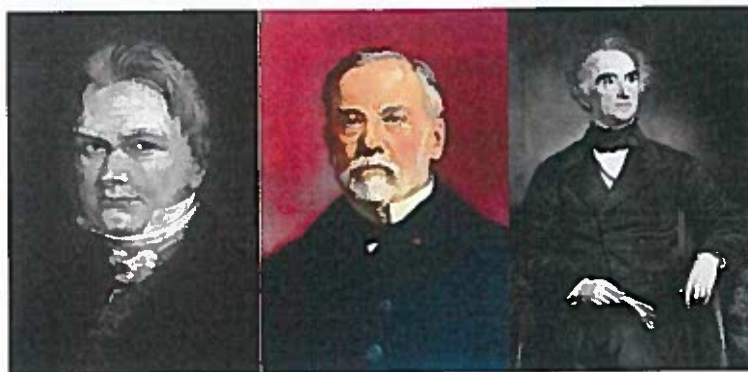


Figura 1 – Jöns Jacob Berzelius (1779-1848), Louis Pasteur (1822-1895) e Justus von Liebig (1803-1873). Adaptado de Mira (2013).

Em 1955 foi desenvolvido um método de determinação da estrutura primária das proteínas, sendo a insulina a primeira a ser sequenciada e, aproximadamente, dez anos depois, a cristalografia de *raio x* determinou a estrutura tridimensional da lisozima, iniciando-se assim a bioquímica e a biologia estrutural responsável pela compreensão do funcionamento enzimático (Zimmer *et al.*, 2009).

1.2. Definição de enzima

As enzimas são proteínas, polímeros de cadeia longa com aminoácidos interligados através de ligações peptídicas sucessivas numa determinada sequência genética, que apresentam atividade catalítica. Estas são catalisadoras de reações bioquímicas, isto é, atuam possibilitando uma nova reação que exige uma energia de ativação menor, acelerando o processo. A sua eficiência é medida pelo número de transformações moleculares, ou seja, esquematicamente, é explicada pelo número de moléculas de substrato convertido em produto, por unidade de tempo. Isso significa que, em geral, uma enzima catalisa um e só um tipo de reação química. Conseqüentemente, o tipo de enzima encontrado numa célula determina o tipo de metabolismo que a célula efetua (Mira, 2013).

Estas cadeias polipeptídicas dobradas são mantidas juntas por forças moleculares relativamente fracas. A estrutura dobrada determina a integridade do sítio catalítico dentro da enzima e pode ser facilmente rompida por mudanças energéticas no ambiente da enzima. Este fenômeno é chamado de “desnaturação” e pode ser reversível ou não, dependendo da severidade da deformação e dos danos estruturais (Food Brasil, 2011).

As enzimas contêm um centro ativo, denominado apoenzima e, algumas vezes, um grupo não proteico, denominado co-enzima. Ao total da molécula é dado o nome de haloenzima. Dependendo do tipo de ligação, o grupo prostético pode ser separado da proteína. Em alguns casos, as enzimas ligam-se ainda a moléculas orgânicas de baixo peso molecular ou a íons metálicos, cuja função é ativar as enzimas a eles ligados, denominados co-fatores (Food Brasil, 2011). A natureza química destes é muito variável, derivando, por exemplo, de um ou mais íons metálicos (como o ferro) ou de uma molécula orgânica (como a vitamina B12) e podendo participar diretamente na

reação enzimática. Os cofatores que possuem uma forte ligação às enzimas distinguem-se das outras co-enzimas por não se libertarem do sítio ativo durante a reação catalisadora (Mira, 2013).

Por outro lado, existem os inibidores enzimáticos, que diminuem ou eliminam a atividade enzimática e esta inibição pode ser reversível ou irreversível. A inibição reversível engloba dois tipos: a competitiva e a não competitiva. A primeira ocorre quando o inibidor se liga reversivelmente ao mesmo sítio de ligação do substrato e o efeito é revertido com o aumento da concentração do substrato (sítio ativo). Este tipo de inibição depende das concentrações do substrato e do inibidor. A inibição enzimática reversível não-competitiva ocorre quando o inibidor se liga reversivelmente à enzima num local próprio (sítio alostérico), podendo estar ligado ao catalisador ao mesmo tempo que o substrato. Este tipo de inibição depende apenas da concentração do inibidor. Na inibição enzimática irreversível, há uma modificação covalente e definitiva no sítio de ligação ou no sítio catalítico da enzima (Mira, 2013).

1.3. Classificação e estrutura

As reações químicas que ocorrem no organismo são de diferentes tipos, necessitando de catalisadores diferentes, pelo que as enzimas foram agrupadas em seis classes principais segundo o seu tipo de reação (Mira, 2013):

- Oxidorredutases – as desidrogenases e oxidases catalisam reações de transferência de eletrões, ou seja, reações de oxirredução;
- Transferases – As quinases e as transaminases, por exemplo, catalisam reações de transferência de grupos funcionais, como grupos amina, fosfato, carboxil, etc.;
- Hidrolases – as peptidases, por exemplo, catalisam reações de hidrólise de ligações covalentes; as liases catalisam quebras de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amónia e gás carbónico;
- Isomerases – catalisam reações de interconversão entre isómeros ótimos ou geométricos. As epimerases são exemplos;

- Ligases – catalisam reações de formação e novas moléculas a partir da ligação de duas já existentes, sempre à custa de energia (ATP). As sintases são um exemplo.

Podem ainda ter uma estrutura primária, secundária, terciária ou quaternária sendo que a primária refere-se ao tipo de sequência dos aminoácidos na molécula proteica; a secundária à estrutura espacial, tridimensional, que a molécula assume. É formada pela associação dos membros próximos da cadeia polipeptídica e é mantida através de pontes de hidrogénio; a terciária, também chamada de estrutura helicoidal, é a forma segundo a qual a secundária se arranja, se dobra e se enovela, formando estruturas globulares rígidas, estabilizada por ligações de diversos tipos como pontes de hidrogénio, hidrofóbicas, iónicas, eletrostáticas e covalentes, estas últimas representadas por pontes de dissulfito entre os resíduos de cisteína; a quaternária é a forma como as diversas estruturas terciárias ou as subunidades se associam (Mira, 2013).

Cada classe enzimática divide-se em subclasses que identificam a enzima em termos mais específicos, representadas pelo segundo algarismo da sua designação. O terceiro algarismo define o tipo de atividade enzimática e o quarto corresponde ao número da enzima dentro da sua classe. As enzimas podem também ser designadas por nomes que obedecem a uma sistemática e são constituídas por duas partes: uma indicando o substrato e a outra indicando a natureza da reação, mas são normalmente identificadas através de nomes triviais para simplificar. Por exemplo, a enzima classificada como 3.2.1.2 é denominada sistematicamente de α -1-4-glucanmalto-hidrólise mas é comumente conhecida como amilase (Food Brasil, 2011).

1.4. Especificidade enzimática

A sua especificidade faz com que estas só hidrolisem ou sintetizem um composto em específico e deve-se, principalmente, à existência de um sítio ativo, parte da enzima que difere da proteína, local de ligação do substrato. O sítio ativo de uma enzima é o arranjo tridimensional de aminoácidos de uma determinada região da molécula, geralmente complementar à molécula do substrato e, ideal espacial e eletricamente, para a ligação do mesmo (Mira, 2013).

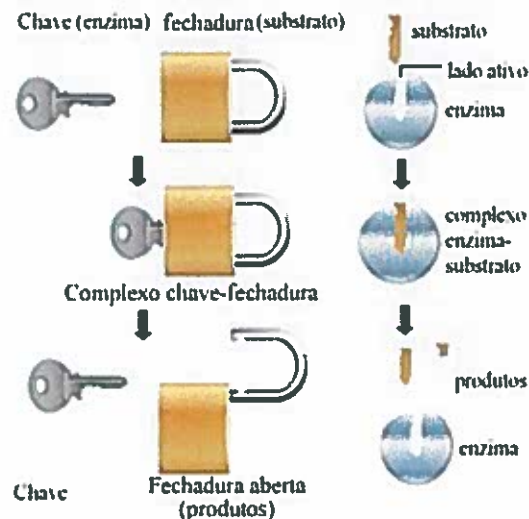


Figura 2 – Modelo de ação enzimático. Adaptado de Fogaça, 2013.

O composto intermediário resultante, o complexo enzima-substrato (ES), é posteriormente decomposto em enzima e produto da reação (P) (Figura 2). A quantidade de enzima exigida no processo é pequena e não influi na variação genética da reação. No entanto, a cinética das reações é influenciada pela concentração do substrato e da enzima, uma vez que o aumento da concentração da enzima é diretamente proporcional ao crescimento da velocidade de reação, para uma mesma concentração de substrato. Ocorrendo o contrário, temos uma subutilização do sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, pouco produto é formado. Se o substrato for aumentado, a reação atinge a velocidade máxima até certo ponto, produzindo a máxima quantidade de produto para uma quantidade de enzima pré-determinada – reação saturada – e, a partir desse momento, a velocidade não mais se altera (Mira, 2013).

1.5. Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

Cada enzima tem uma temperatura específica para o seu desempenho máximo mas a maioria é eficaz em temperaturas que variam entre os 30°C e os 70°C, não resistindo, em geral, a temperaturas acima dos 100°C. O aumento da temperatura no intervalo médio anterior faz com que a velocidade da reação duplique a cada aumento de 10°C até à velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer (Mira, 2013).

O efeito da temperatura é muito complexo, uma vez que tanto pode acelerar uma reação como acabar por inativar a enzima, causando uma desnaturação proteica pelo calor. A diminuição da temperatura abaixo do mínimo requerido para que determinada enzima exerça a sua função pode também levar à inativação da mesma (Mira, 2013).

Já quanto ao pH, cada reação tem também um pH ótimo que, para a maioria das enzimas, situa-se entre os 4.5 e os 8.0. Valores muito baixos ou altos de pH podem causar uma desnaturação proteica considerável e consequente inativação enzimática. É portanto útil saber em que faixa de pH a enzima é mais estável já que o pH de máxima estabilidade nem sempre coincide com o de máxima atividade (Mira, 2013).

As variações de temperatura e pH sobre os aminoácidos que compõem a estrutura enzimática podem provocar ainda mudanças que ficam aquém da desnaturação, distorcendo apenas o sítio ativo ou reduzindo o número ligações, diminuindo a sua atividade (Food Brasil, 2011).

1.6. Mecanismos de ação enzimática

As enzimas podem atuar de diversas formas (Mira, 2013):

- Baixando a energia de ativação, através da criação de um ambiente no qual o estado de transição é estabilizado (por exemplo, distorcendo a forma da molécula do substrato) – a enzima distorce o substrato, gastando energia de modo a baixar a energia do estado de transição da reação catalisada, resultando numa diminuição global da energia requerida para completar a reação;
- Providenciando uma via alternativa, por exemplo, reagindo com o substrato para formar um complexo enzima-substrato de existência impossível sem a presença de enzima;
- Reduzindo a variação da entropia da reação ao orientar os substratos de forma correta para facilitar a reação. Na ausência da enzima, as moléculas colidem em todas as direções possíveis de forma aleatória, um processo menos eficiente do que na presença da enzima. Pesquisas recentes apresentaram novos conhecimentos sobre a ligação entre a dinâmica interna de uma enzima e o seu

mecanismo de catálise. A dinâmica interna de uma enzima é descrita como o movimento de partes internas (como aminoácidos individuais, grupos de aminoácidos, um laço de cadeia, uma hélice alfa, folhas beta vizinhas ou até domínios proteicos internos) destas biomoléculas que podem ocorrer a diversas escalas de tempo. Redes de resíduos de aminoácidos de uma estrutura podem contribuir para a catálise através de movimentos dinâmicos. Os movimentos em proteínas são importantes para diversas enzimas, mas o tipo de reação que elas catalisam é que determina que tipos de movimento são mais importantes: pequenas e rápidas vibrações ou lentas e significativas alterações. Estes estudos têm consequências na compreensão dos efeitos alostéricos, na produção industrial de enzimas e no desenvolvimento de novos fármacos;

Os mecanismos de ação enzimática e as interações das enzimas com o ambiente físico e químico podem ser descritos com razoável precisão mas, na maioria das equações, as constantes e a cinética enzimática foram elaboradas para situações que ocorrem em condições previsíveis dentro das células vivas. A compreensão da relação entre as sequências de aminoácidos e a eficiência das estruturas tridimensionais e catalíticas das enzimas são agora suficientemente compreendidas para permitir que os cientistas moleculares mudem as estruturas das enzimas para melhorar as suas propriedades de transformação tecnológicas, tais como a resistência ao calor, definição do pH ótimo, resistência aos inibidores catalíticos e mesmo preferência de substratos, através da engenharia proteica (Food Brasil, 2011).

1.7. Instabilidade e estabilidade enzimática

As enzimas possuem um tempo de vida finita, ou uma meia-vida, devido à instabilidade física inerente à ação de antagonistas/inibidores e à intoxicação por contaminantes na mistura de reação. A maioria dos inibidores de enzimas não está presente, por exemplo, nos alimentos porque geralmente são agentes venenosos (metais pesados ou compostos organometálicos), sendo muito comum a sua presença (Food Brasil, 2011).

1.8. Funções biológicas enzimáticas e a sua utilização

As enzimas exercem uma ampla variedade de funções nos organismos vivos sendo indispensáveis na transdução de sinais ou na regulação celular. Através da sua ação, podem gerar movimento, as ATPases que funcionam como bombas iônicas na membrana celular e estão envolvidas no processo de transporte ativo ou como algumas funções mais especiais como a luciferase que gera a luz nos pirilampos. Os vírus podem ainda conter enzimas que auxiliam na infecção de células (por ex., no HIV a transcriptase reversa) ou na libertação celular de vírus (neuraminidase no vírus *influenza*) (Mira, 2013).

Por outro lado, enzimas como a amilase e as proteases quebram grandes moléculas, como o amido e as proteínas, respetivamente, em moléculas de menores dimensões de maneira a que estas possam ser absorvidas no intestino. Diferentes enzimas atuam sobre diferentes tipos de alimentos, trabalhando em conjunto ou seguindo uma ordem de atuação específica, formando vias metabólicas. Nestas, a enzima atua sobre um substrato e o seu resultado é entregue a outra enzima para ser catalisado, e por aí adiante. Sem a presença de enzimas, o metabolismo não progride através dos mesmos passos, nem é suficientemente rápido para que sirva as necessidades da célula. A glucose, por exemplo, pode reagir diretamente com o ATP para transformar um produto fosforilado em um ou mais carbonis mas, na ausência de enzimas, este processo é tão lento que se torna insignificante (Mira, 2013).

1.8.1 Enzimas de uso terapêutico

Atualmente, as enzimas são utilizadas em massa nos produtos de limpeza, na área petroquímica produzindo biodiesel através do uso de lipases, na produção de sumos com a utilização das pectinases, na terapêutica e no diagnóstico, entre outras áreas (Zimmer *et al.*, 2009).

O uso terapêutico das enzimas remonta ao final do século XIX, quando preparações de enzimas pancreáticas de origem suína eram utilizadas como auxiliares digestivos. A pureza, a fonte e a dose são consideradas cruciais em enzimas utilizadas nas aplicações

digestivas. No entanto, o uso endovenoso de enzimas microbianas requer uma purificação de alta seletividade, acoplada à preservação da atividade enzimática e evitando a desnaturação proteica. Diversos requisitos devem ser considerados aquando do uso de enzimas com fins terapêuticos, entre eles a baixa resposta imunológica, a alta atividade e a estabilidade no pH fisiológico, a baixa taxa de eliminação e a independência de cofatores exógenos. Além disso, quando se utilizam microrganismos como fonte destas moléculas, devem-se optar por espécies não patogênicas evitando a presença de toxinas nas preparações. A relevância do uso de enzimas como medicamento advém do fato de pequenas quantidades de catalisador biológico poderem produzir efeitos bastante específicos em condições fisiológicas. Enzimas especiais exigem alto nível de pureza na decorrência da sua aplicação e é necessária uma sequência de processos de purificação até à obtenção final da enzima. Este processo é de extrema complexidade e o custo desta etapa pode representar cerca de 80% do custo do produto final (Zimmer *et al.*, 2009).

Na prática, poucas enzimas possuem as propriedades necessárias para este fim, uma vez que a instabilidade dos biocatalisadores, a suscetibilidade ao ataque de proteases, a dificuldade de acesso ao órgão-alvo e a antigenicidade representam algumas das limitações da terapia enzimática. Estas dificuldades são contornadas através de diferentes estratégias de formulação como a conjugação química com polímeros utilizada para diminuir a resposta imune, um dos efeitos mais comuns das enzimas microbianas. Além disso, a incorporação de enzimas em lipossomas (vesículas microscópicas compostos por uma ou mais membranas lipídicas envolvendo um compartimento aquoso) confere diminuição da toxicidade, direcionando o acesso ao órgão-alvo e reduzindo a resposta imunológica (Zimmer *et al.*, 2009).

De entre as principais enzimas terapêuticas de origem microbiana, destaca-se a L-asparaginase utilizada para o tratamento da leucemia linfocítica aguda. Esta enzima é capaz de esgotar o *stock* de asparagina plasmática, causando a morte das células blásticas que não possuem a enzima, não afetando as sadias uma vez que não necessitam do aporte exógeno de asparagina. Esta enzima é obtida principalmente através de microrganismos como a *Escherichia coli*, havendo fórmulas no mercado da enzima nativa de ambos os organismos (Zimmer *et al.*, 2009).

De acordo com a finalidade, as enzimas podem ser administradas por via tópica, oral, intravaginal e parenteral, apresentando-se no último caso, geralmente na forma de preparações liofilizadas contendo sais tamponantes biocompatíveis. Atualmente existe no mercado uma ampla variedade de medicamentos à base de enzimas para aplicação como anti-inflamatórios, antissépticos, auxiliares digestivos, na reposição de enzimas hemostáticas, na inibição da coagulação, na reposição de enzimas metabólicas, no tratamento da fibrose cística bem como na terapia contra o cancro (Cruz *et al.*, 2008; Zimmer *et al.*, 2009). No mercado existe, atualmente, uma ampla variedade de medicamentos com base enzimática, para aplicação como auxiliares digestivos, anti-inflamatórios, anti-sépticos, na reposição de enzimas hemostáticas, na inibição da coagulação, na prevenção de lesões de reperfusão, no tratamento da icterícia neonatal, no tratamento da fibrose cística, na reposição de enzimas metabólicas e na terapia do cancro (Cruz *et al.*, 2008).

1.8.2. Enzimas e a indústria alimentar

A indústria alimentícia beneficia também das enzimas que tornam os alimentos mais saborosos, nutritivos, digestivos e até mais bonitos onde, por exemplo, a amilase maltogénica permite a fabricação de pães mais macios e volumosos com sabor e aroma mais agradáveis e que permanecem frescos por muito mais tempo; a quimosina a coagulação do leite para a produção dos mais variados tipos de queijo e a β -glicanase um tom mais atrativo à cerveja, deixando-a mais clara e com um tom dourado. Não são, no entanto, consideradas aditivos alimentares como os adoçantes ou antioxidantes porque embora permaneçam no produto final não exercem qualquer função neste (Mira, 2013).

Industrialmente são obtidas através de microrganismos e consideradas fontes atrativas e de baixo custo na produção de metabolitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto. Acrescenta-se ainda a vantagem da produção de não estar condicionada por questões sazonais ou geográficas e pela possibilidade do uso de matérias-primas pouco dispendiosas. Uma ampla gama de enzimas, com diferentes fontes e para diversos usos terapêuticos e diagnóstico encontram-se no mercado (Zimmer *et al.*, 2009).

O interesse no uso de enzimas para o processamento de alimentos deve-se a diversos fatores, entre eles a especificidade de ação, ação rápida e eficiente em baixas concentrações, atividade em condições moderadas de pH, temperatura e pressão, fácil controlo da reação e baixa toxicidade. De acordo com a sua origem, as são classificadas em microbianas, de origem animal e de origem vegetal. Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, o uso de células microbianas como fonte de enzimas foi alargado à escala industrial, permitindo não só o aumento na produção de enzimas já obtidas por outros processos mas também a produção de novas enzimas de interesse comercial (Mira, 2013).

2. Sistema de defesa: enzimas antioxidantes

Os primeiros organismos a sofrerem o processo evolutivo de adaptação ao meio terrestre eram essencialmente anaeróbios uma vez que a atmosfera da altura era pobre em moléculas de oxigénio. À medida que a concentração desta molécula aumentava, os longos períodos de evolução e de adaptação biológica dos seres trouxeram consequências toxicológicas para estes, já que os metabolitos do O₂ são muito reativos. Como resposta, enquanto alguns organismos desapareceram, outros desenvolveram defesas antioxidantes contra a toxicidade do O₂ e das suas espécies derivadas (Cerqueira *et al.*, 2007; Matos & Fernandes, 2005). Os processos de pressão seletiva e de evolução natural fizeram com que surgissem inúmeros mecanismos de defesa como os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, cujo principal objetivo é a proteção celular dos danos causados pela absorção das moléculas de O₂ (Matos & Fernandes, 2005; Ribeiro *et al.*, 2005).

2.1. Radicais livres e ROS

Os radicais livres são espécies químicas (átomos ou iões) que apresentam um eletrão por emparelhar na órbita externa da sua estrutura atómica e que têm uma grande instabilidade e alta reatividade (Cerqueira *et al.*, 2007; Zimmermann & Kirsten, 2008). São conhecidos quimicamente desde o início do século XX, inicialmente usados para descrever os compostos intermediários em química orgânica e inorgânica, sendo que um rol de definições químicas foi sugerido para os mesmos. Em 1954, o trabalho pioneiro de Daniel Gilbert e Rebecca Gersham foi publicado (*cit in* Cassarino e Bennett, 2000) e referiram-nos como importantes nos ambientes biológicos e responsáveis por processos celulares de deleção. Em 1956, Herman Denham (*cit in* Cassarino e Bennett, 2000) sugeriu que estas espécies estariam envolvidas em processos fisiológicos e no processo de envelhecimento. Esta hipótese, a teoria da implicação dos radicais livres no envelhecimento, inspirou numerosos estudos que se debruçavam sobre estes e as espécies oxigénio-reativas (ROS) como chave nas reações bioquímicas e na resposta celular.

A própria molécula de O_2 , no seu estado fundamental, contém dois elétrons desemparelhados no último orbital molecular, mas reage lentamente com os compostos na mesma condição, sendo capaz de uma existência independente em intervalos de tempos variáveis, o que faz com que não seja considerada, totalmente, como um radical livre (Cerqueira *et al.*, 2007; Zimmermann & Kirsten, 2008). Desde a descoberta do O_2 no século XVIII por Antoine Lavoisier, a necessidade de controlar os níveis deste nos organismos foi reconhecida. Esta molécula tem papéis contraditórios, sendo essencial para a vida mas também uma substância tóxica, como descreveu Priestly (*cit in* Cassiano e Bennett, 2000), em 1775, comparando a sua toxicidade no organismo ao efeito de uma vela a arder. Por exemplo, os casos de cegueira em recém-nascidos prematuros, durante os anos 40, foram associados às altas concentrações de oxigênio nas incubadoras recém-inventadas e esta patologia, denominada de prematuridade de retinopatia, foi facilmente controlada pela modulação da concentração do O_2 no seu interior (Cassiano e Bennett, 2000).

A produção de radicais livres advém de diversas fontes como a cadeia respiratória mitocondrial (que envolve o complexo coenzima NADHQ redutase ou outras formas reduzidas da coenzima Q), da fuga de elétrons oriundos do citocromo P-450 e B5 no retículo endoplasmático (que metabolizam toxinas que reagem com o oxigênio absorvido originando mais radicais livres), pela ação de células fagocitárias ou de peroxissomas (que degradam o tecido lipídico e outras moléculas) e por ações ambientais como a exposição ao tabaco ou à radiação ionizante (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Pôrto, 2001).

Estas espécies tendem a ligar-se formando recetores (oxidantes) e doadores (redutores) de elétrons e obtendo, como produto, espécies oxigênio-reativas ou agentes pro-oxidantes como os radicais hidroxilo (OH), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os aniões superóxido (O_2^-), o óxido nítrico (NO^-) e o peróxido (ROO^-) (Zimmermann e Kirsten, 2008) (Tabela I). Estima-se que cerca de 0.1% do oxigênio utilizado durante a respiração mitocondrial forme ROS (Cerqueira *et al.*, 2007).

Tabela I – Caracterização das principais ROS formadas *in vivo*. Adaptado de Ribeiro *et al.* (2005).

Intermediário	Formação	Vida	Locais de formação
Radical superóxido	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 1 elétron	Decomposição enzimática na velocidade aproximada de 5×10^3 em pH 7.0	Reações de auto-oxidação envolvendo ciclos redox e flavoproteínas
Peróxido de hidrogênio	Formado a partir da redução parcial do O_2 por 2 elétrons	Decomposição enzimática	Vias catalisados por oxidase pela superóxido dismutase
Radical hidroxilo	Formado a partir da redução do O_2 molecular por 3 elétrons na reação de <i>Fenton</i> e <i>Haber-Weiss</i> , catalisada por metais	10^{-9} segundos	Locais adjacentes à formação do anião superóxido/peróxido de hidrogênio, na presença de metais e, principalmente, do ferro; produto da reação do óxido nítrico com o radical superóxido;
Radical alcóxil	Radical orgânico centrado no oxigênio	10^{-6} segundos	Intermediários da peroxidação lipídica da membrana
Radical peróxilo	Formado a partir de hidroperóxidos orgânicos	7 segundos	Intermediários na peroxidação de lípidos da membrana
Oxigênio molecular simpleto	Primeiro estado excitado do oxigênio molecular com nível de energia de 22 kcal/mol acima do estado fundamental ou oxigênio tripleto	10^{-5} segundos	Locais metabólicos por definir

Embora, numa primeira leitura, a formação das ROS pareça uma falha evolutiva das estruturas aeróbias, evidências mostram que estas são imprescindíveis nas mais variadas funções fisiológicas como a participação em vias de sinalização celular, papel na defesa imunitária e transdução do sinal neuronal (Behl & Moosmann, 2002; Cerqueira *et al.*, 2007; Olempska-Beer *et al.*, 2006).

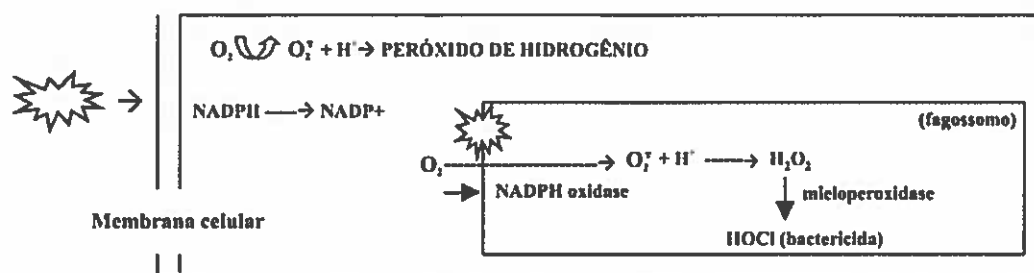


Figura 3 – Formação do radical superóxido com a catalisação do O_2 pela NADPH oxidase.

Adaptado de Ribeiro *et al.* (2005).

Estes radicais têm, por exemplo, a capacidade de subtrair o hidrogênio das cadeias, formando espécies reativas lipídicas ou um radical lipídico não estabilizado após uma reestruturação molecular, tendem a combinar-se com o O_2 e a produzir o radical peróxido. O potencial oxidativo deste é suficiente para atacar o hidrogênio das cadeias, formando novos peróxidos e radicais que perpetuam a reação oxidativa. Estas ações, quando ocorrem nas membranas celulares, levam ao decréscimo da fluidez da membrana, à inativação de enzimas metabólicas chave e à intensificação da perda de potencial de membrana e de homeostase iônica, inclusive, nas células neuronais (Pôrto, 2001).

O organismo confronta-se e controla a presença destas moléculas pro-oxidantes continuamente (Cassiano e Bennett, 2000). Para se defender dos radicais livres naturalmente formados, o organismo apresenta mecanismos de defesa em três níveis distintos (Ribeiro *et al.*, 2005): prevenção da formação de ROS com eliminação dos radicais livres, eliminação das ROS e reparação das moléculas modificadas pelas ROS. O balanço entre os pro-oxidantes e os antioxidantes é altamente regulado pela sua importância na manutenção celular e nas funções bioquímicas (Cassiano e Bennett, 2000).

A prevenção da formação destas inclui mecanismos antioxidantes, no seu sentido mais amplo, citando-se a restrição do *spin* do oxigênio, que diminui a sua reatividade com outras moléculas, o transporte de oxigênio na forma ligada, a quelação de metais durante o transporte e armazenamento, evitando a ocorrência da reação de *Fenton*, a eficiência da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, mantendo controlada a

formação de ROS e a organização estrutural do DNA em cromatina (Ribeiro *et al.*, 2005). Por outro lado, os mecanismos de reparo incluem o sistema de reparo do DNA e o sistema reparador de proteínas lesadas. As enzimas envolvidas nesta reparação são, entre outras, a DNA-glicosilase, a DNA AP endonuclease ou a DNAligase, que agem por excisão ou por recombinação, assim como a ativação da polissintase. No entanto, o excesso deste mecanismo de resposta pode levar a uma extensa lesão do DNA por suicídio celular. Há ainda sistemas proteolíticos no citosol e nas mitocôndrias das células que reconhecem as proteínas lesadas (Gilgun-Sherki *et al.*, 2011; Pôrto, 2001).

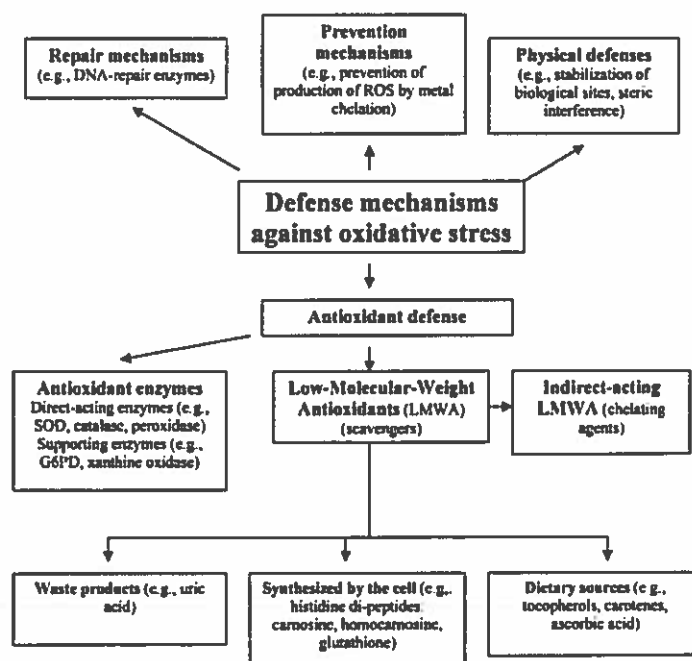


Figura 4 – Classificação dos antioxidantes. Adaptado de Kohen e Nyska (2002).

Os antioxidantes endógenos e exógenos, como as glutationas (GSH), a catalase (CAT), a superóxido dismutase, as vitaminas C e E, os carotenoides ou os flavonóides, são poderosas armas contra os pro-oxidantes (Esposito *et al.*, 2002; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001). Este sistema de defesa antioxidante pode ser classificado em defesa primária (complexos antioxidantes, vitaminas ou enzimas antioxidantes) e defesa secundária (enzimas reparadoras de DNA). Normalmente existe um equilíbrio entre a formação das ROS e a sua eliminação pelo sistema antioxidante chamado de balanço oxidativo (Ribeiro *et al.*, 2005; Zimmermann & Kirsten, 2008).

Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção e a eliminação das ROS, com tendência para o predomínio da produção (aumento de ROS), diz-se que entrou em *stress* oxidativo (Figura 5), já que a produção de radicais livres excede a capacidade de defesa antioxidante da célula, com subsequente dano para as macromoléculas celulares como as proteínas, os lípidos ou as moléculas de DNA. Tal ocorre como resultado de um mecanismo de proteção defeituoso, pelo aumento anormal da concentração de ROS (ou ambos) ou mesmo como resultado de uma lesão radical direta, possivelmente de origem ambiental, como o tabaco ou raios ultra-violeta (Barbosa *et al.*, 2006; Esposito *et al.*, 2002; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Kalyanaraman, 2013; Kohen e Nyska, 2002; Padgett *et al.*, 2013; Pôrto, 2001; Schreibelt *et al.*, 2007). Além de induzirem o *stress* oxidativo e de atuarem como segundos mensageiros, as ROS afetam ainda a maturação adaptativa por promoção da síntese de citocinas pro-inflamatórias como a TNF- α e a IL-1 por macrófagos e células dendríticas, que induzem uma terceira resposta imune e levam ao aparecimento de células T de memória (Padgett *et al.*, 2013).

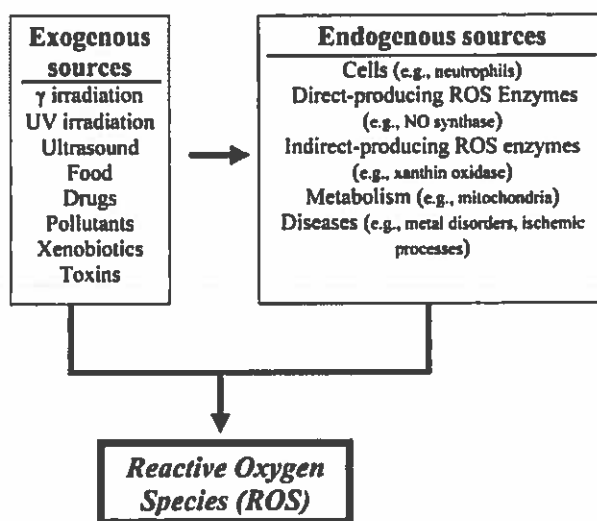


Figura 5 – Fontes exógenas e endógenas das ROS. Adaptado de Kohen e Nyska (2002).

A exposição celular a radiações, a poluentes, a tabaco, a alimentos, a medicamentos e a contaminantes industriais constitui uma das principais fontes à formação de ROS e à sua presença em excesso (Kohen e Nyska, 2002).

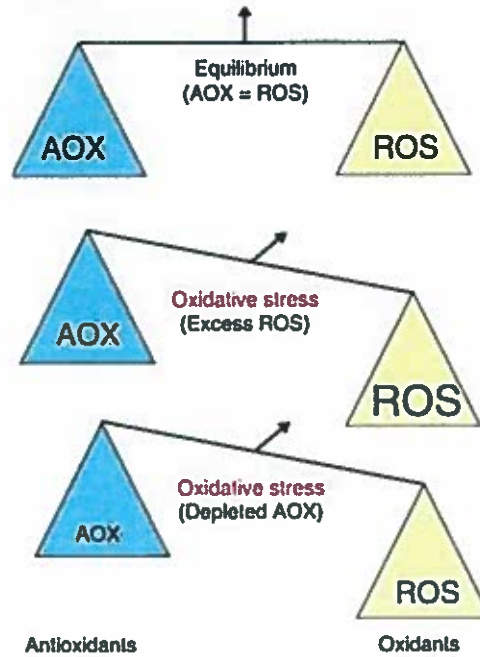


Figura 6 – Balanço oxidativo vs stress oxidativo. Adaptado de Nicholls e Budd (2012).

Quando produzidos num volume suficiente que alcance o stress oxidativo podem promover distúrbios metabólicos e celulares (Figura 6), incluindo quebra das bases do DNA, aumento do cálcio livre intracelular, lesão do mecanismo de transporte iônico da membrana ou outras proteínas específicas, oxidação de resíduos de cisteína, das proteínas citoplasmáticas ou peroxidação de lipídios (Pôrto, 2001). Quanto ao DNA, ocorre oxidação de resíduos dos hidratos de carbono e modificação extensa das quatro bases. A timina, por exemplo, é convertida em timina glicol e 5-hidroximetiluracil (excretado na urina humana, podendo por isso ser usada como índice do nível de ataque ao DNA pelos radicais livres) e a 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, que se forma pelo ataque do hidroxilo sobre a base guanina. Em média ocorrem 10000 ataques/dia ao DNA celular humana, os quais são abortados pelo seu sistema de reparação ou pelo sistema antioxidante, tendendo a acumular-se no processo de envelhecimento (Pôrto, 2001). Tal como nas membranas celulares, o DNA mitocondrial (mtDNA) é particularmente susceptível ao ataque dos radicais livres, apresentando uma tendência de lesão 10 vezes maior quando comparado com o DNA nuclear em cérebros humanos. Esta vulnerabilidade é consistente com a sua proximidade à cadeia respiratória mitocondrial, ao fluxo contínuo de ROS e à falta de mecanismos reparadores eficientes (Kohen e Nyska, 2002; Pôrto, 2001).

A peroxidação lipídica ocorre nos ácidos gordos poliinsaturados (PUFA) por oxidação não enzimática, os quais são elementos constitucionais das membranas celulares. Entre as ROS capazes de iniciar a peroxidação das PUFA encontram-se o OH e o NO₂. Estes radicais subtraem o hidrogénio das cadeias de PUFA, formando espécies reativas lipídicas ou radicais lipídicos, estabilizados após a reestruturação molecular e combinando-se com o O₂ para a produção de radicais livres. Estes atacam o hidrogénio das cadeias adjacentes, formando peróxidos lipídicos e novos radicais livres, além de perpetuarem a reação oxidativa. Metais como o ferro e o cobre são conhecidos por serem aceleradoras da decomposição destes peróxidos lipídicos, levando a uma infinidade de produtos finais que facilitam os *cross-links* entre proteínas. Em geral, a lesão lipídica e proteica resulta no decréscimo da fluidez da membrana, na inativação de enzimas metabólicas chave como as ATPases e na intensificação da perda do potencial de membrana e homeostase iónica como no caso do cálcio, levando à estimulação de fosfolipases e a subsequente libertação de ácido araquidónico que intensifica a formação de mais radicais livres (Kohen e Nyska, 2002; Pôrto, 2011).

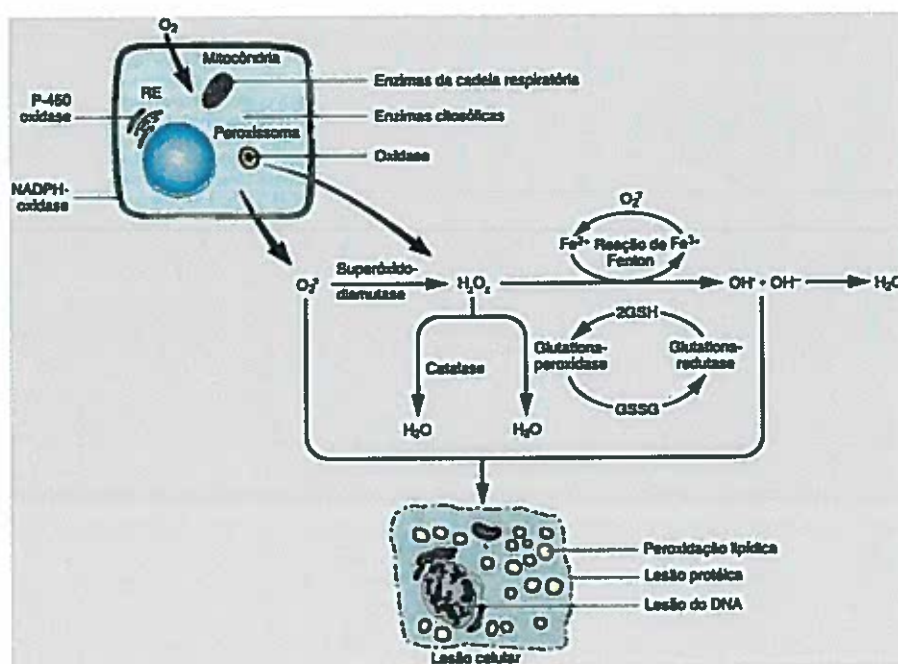


Figura 7 – O₂ nas células. Adaptado de Fogaça, 2013.

O conhecimento da capacidade antioxidante dos *scavengers* químicos específicos e da sua atividade nos diferentes oxidantes é fundamental para compreender e prever a

suscetibilidade dos tecidos biológicos ao *stress* oxidativo. No entanto, a complexidade do balanço celular entre um determinado oxidante e a resposta antioxidante dificulta que se generalize o impacto causado pelas ROS ou a sua resposta a um agente antioxidante (Matos & Fernandes, 2005).

2.2. Defesa e enzimas antioxidantes

Os antioxidantes são um conjunto heterogéneo de substâncias formados por vitaminas, minerais, compostos vegetais e ainda enzimas que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres no corpo (Tabela II). O termo antioxidante significa que estas moléculas “impedem a oxidação” que ocorre durante as reações metabólicas ou que é causada por fatores exógenos, como as radicações ionizantes (Figura 8) (Messias, 2009).

Tabela II – Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Adaptado de Matos & Fernandes (2005).

Sistema	Ação
Não enzimático	
• Vitamina E	Quebram reações em cadeia
• B-caroteno	<i>Quencher</i> do oxigénio
• Ubiquinol-10	<i>Scavenger</i> de radicais
• Vitamina C (ascorbato)	Diversas funções antioxidantes
• Glutatião (GSH)	Diversas funções antioxidantes
• Ácido úrico	<i>Scavenger</i> de radicais
• Bilirrubina	Antioxidante plasmático
• Flavonóides	Antioxidante de plantas
• Proteínas plasmáticas	Ligação de metais
Enzimáticos	
• <i>Superóxido dismutase</i>	Dismutação do radical superóxido
• <i>Glutatião peroxidase</i>	Redução do peróxido de hidrogénio e de outros hidroperóxidos
• <i>Catalase</i>	Dismutação do peróxido de hidrogénio
• <i>Glutatião S-transferase</i>	Redução de peróxidos
• <i>NADPH-quinona oxidoreductase</i>	Redução de dois electrões
• <i>Glutatião reductase</i>	Manutenção dos níveis de GSH
• Forneecedor de <i>NADPH</i>	NADPH ara GSSG reductase
• Sistemas transportadores	Exportação de GSSG
• Sistemas reparadores	Exportação de tióster
	Sistema de reparação de DNA
	<i>Turnover</i> de proteínas oxidadas
	<i>Turnover</i> de fosfolípidos oxidados

Halliwell & Gutteridge (*cit in* Zimmermann & Kirsten, 2008) definiram antioxidante como uma substância presente em concentrações baixas, quando comparada às concentrações existentes do substrato oxidante (como substrato oxidante consideram-se quase todas as substâncias orgânicas e inorgânicas que se encontram nas células vivas como as proteínas, os lípidos, os carboidratos e as moléculas de DNA), que agem sacrificando a sua própria integridade molecular para evitar alterações nas moléculas e previnem ou atrasam significativamente a oxidação dos substratos susceptíveis (Tabela III) (Zimmermann & Kirsten, 2008).

Tabela III – Principais enzimas antioxidantes que catalisam a eliminação de ROS. Adaptado de Ribeiro *et al.* (2005).

Enzima	Ação	Comentário
<i>Superóxido dismutase</i>	$+ + 2 \text{H}^{\cdot} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Descoberta em 1969 e presente no citosol, na mitocôndria e extracelular;
<i>Glutationa peroxidase</i>	$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$	Foram descritas quatro enzimas diferentes Gpx em mamíferos: Gpx1, Gpx2, Gpx3 e Gpx4. Contém selênio e atuam no citosol e na mitocôndria. Juntamente com GSH e glutatona reduzida, constitui o denominado sistema Gpx;
	ROOH = peróxido	
	GSH = glutatona reduzida GSSH = glutatona oxidada	
<i>Glutationa S-transferase</i>	Transferases que catalisam reações de conjugação entre glutatona (GSH) e moléculas oxidadas;	São peroxidases, independentes de selênio, utilizadas para a remoção de hidroperóxidos orgânicos;
<i>Catalase</i>	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	A principal função da enzima é eliminar peróxido formado no peroxissoma diminuindo o risco da formação de radical hidroxilo, via reação de <i>Fenton</i> ;

Através da ação das enzimas superóxido dismutase, glutatona redutase, glutatona peroxidase e catalase, o organismo mantém a concentração de ROS dentro dos limites fisiológicos e através do sistema tioredoxina regula os níveis de alvos moleculares oxidados, os quais apresentam uma comunicação estreita com os ajustes relacionados à

expressão genética (Tabela III) (Ribeiro *et al.*, 2005). Uma falha no balanço oxidativo contínuo leva a *stress* oxidativo, implicados numa variedade de desordens patológicas e, apesar de os alvos de cada doença diferirem entre patologias, há pontos comuns previamente identificados (Behl e Moosmann, 2002):

- Aumento dos níveis de metabolitos oxidativos encontrados em tecido pós-morte de pacientes com doenças degenerativas;
- Reações compensatórias de defesa e uma resposta ao *stress* oxidativo nas células nervosas;
- Distúrbios no metabolismo mitocondrial, que levam à fuga de ROS vindos da cadeia de respiração;

Os principais mecanismos de ação para obtenção do balanço oxidativo por compostos antioxidantes incluem a captação de radicais e supressores dos estados excitados, sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam as ROS e a ligação de iões metálicos a proteínas, o que os torna indisponíveis para a produção de espécies oxidantes (Cerqueira *et al.*, 2007; Zimmermann & Kirsten, 2008). Se as células não tiverem capacidade de suprimir esta falha no balanço, ocorrem alterações como o aparecimento de aldeídos pela peroxidação lipídica capazes de induzir a apoptose celular PC12 em ratos, mostrando-o como mediador do *stress* oxidativo indutor da apoptose ou de bases de DNA oxidadas (Schreibelt *et al.*, 2007; Zimmermann & Kirsten, 2008).

A transcrição de genes codificadores da maioria destas enzimas é regulada pela transcrição do fator nuclear fator-E2-relacionado (Nrf2) e por elementos de resposta antioxidante (ARE) nos genes que codificam os antioxidantes enzimáticos (Schreibelt *et al.*, 2007). No entanto, um aumento da expressão destas enzimas endógenas está constantemente a ativar esta transcrição, funcionando de maneira semelhante a um mecanismo de doença auto-imune, onde a cascata Nrf2/ARE pode vir a ser um alvo terapêutico positivo (Schreibelt *et al.*, 2007).

O potencial terapêutico pode também ser benéfico nas desordens neurodegenerativas associadas à presença excessiva de ROS, como na doença de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia ou na doença do neurónio motor. A expressão da cascata Nrf2/ARE foi

detectada no sistema nervoso central de pacientes com esclerose múltipla, já que esta cascata está envolvida na regulação da proteína-1 quimioatrativa dos monócitos e na molécula-1 de adesão de células vasculares, sendo que ambas as proteínas estão implicadas na patogénese da esclerose múltipla (Schreibelt *et al.*, 2007).

Tendo ainda como base a ação antioxidante destas enzimas, diferentes tipos de drogas farmacêuticas têm sido desenvolvidas a partir das características destas, com principal ação na (Behl & Moosmann, 2002):

- Inibição da formação de radicais livres;
- *Scavenging* químico direto (não enzimático) de radicais livres gerados por compostos antioxidantes;
- Detoxificação enzimática de ROS acumulados;
- Suporte a longo termo e indução de defesa celular pela iniciação da transcrição genética;

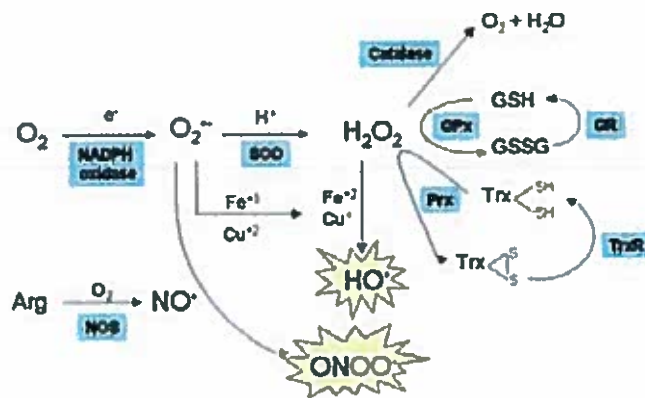


Figura 8 – Esquema das reações e respetivas enzimas (azul) envolvidas na formação de ROS. SOD: superóxido dismutase, GPx: glutatona peroxidase, Prx: peroxidase, GR: glutatona redutase, TrxR: tioredoxina redutase, GSH: glutatona reduzida. Adaptado de Barbosa *et al.*, 2006.

2.2.1. Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) foi isolada a partir de sangue bovino como uma proteína verde-azulada com cobre na sua constituição e que se julgava ser responsável pelo armazenamento deste metal. Em 1969 foi descoberta a sua função catalítica, alterando a sua primeira designação. As SOD são utilizadas como agentes protetores num alargado conjunto de estados patológicos diretamente relacionados com a presença de ROS, como é o caso dos danos causados por radiação, processos inflamatórios, isquemia celular, mecanismos indutores da carcinogénese e patologias neurodegenerativas, sendo que se observa que o *stress* oxidativo induz ou possibilita a atividade das SOD em procariotas e eucariotas (Matos & Fernandes, 2005).

Os radicais superóxido que resultam de reações de fosforilação oxidativa das mitocôndrias são uma constante nos organismos aeróbios. Sugere-se que o mecanismo de catálise envolvido na dismutação do radical superóxido seja semelhante a um mecanismo de *ping-pong*, no qual o ião localizado na enzima oscila entre dois estados oxidativos. As SOD, juntamente com a catalase, formam a defesa enzimática antioxidante primária mais eficiente, convertendo o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio em água e O₂. Investigações efetuadas em vários organismos revelam existirem três tipos diferentes de SODs, cujas diferenças se baseiam no ião metálico presente nos sítios ativos, existindo casos que contêm cobre e zinco, manganésio ou ferro (Matos e Fernandes, 2005; Pôrto, 2001; Schreibelt *et al.*, 2007).

Estes diferentes tipos de SOD podem ser distinguidos pela diferente sensibilidade que apresentam ao cianeto de potássio e ao H₂O₂, sendo a Cu/Zn-SOD caracterizada por ser sensível aos dois inibidores, a Fe-SOD sensível ao H₂O₂ e a Mn-SOD resistente a ambos os inibidores. Em termos de estrutura química, a Fe-SOD e a Mn-SOD são semelhantes, enquanto a Cu/Zn-SOD não apresenta qualquer tipo de relação com as restantes (Pôrto, 2001; Schreibelt *et al.*, 2007).

Exceptuando alguns casos, a Cu/Zn-SOD é encontrada em quase todos os eucariotas. Nos animais encontra-se no citosol, no núcleo, nos peroxissomas, nos lisossomas e no espaço intermembranar das mitocôndrias. Quanto à sua presença em procariotas, tem

vindo a aumentar o número de trabalhos que referem a sua presença em bactérias e cianobactérias. A Mn-SOD encontra-se na matriz mitocondrial de plantas, animais e em bactérias. A Fe-SOD está presente em procariotas e nalgumas plantas, não tendo sido possível localizá-la em tecidos animais (Matos e Fernandes, 2005).

A produção de peróxido de hidrogénio através do superóxido leva a que este seja difundido pelas membranas por ser mais leve e altamente reativo com os radicais hidroxilo. No entanto, as SODs atuam em conjunto com outras enzimas como a catalase, a GPx e as Prxs, removendo o peróxido de hidrogénio e protegendo as células contra o dano oxidativo. Consequentemente, pensa-se que o co-tratamento com enzimas eliminadoras de peróxido de hidrogénio possa ser mais eficaz no tratamento de doenças neuroinflamatórias do que os eliminadores dos superóxidos isoladamente, embora ainda seja desconhecido o real potencial destas enzimas (Behl & Moosmann, 2002; Schreibelt *et al.*, 2007).

2.2.2. *Catalase (CAT)*

Contrariamente ao anião superóxido, que se verificou ser menos reativo, o H_2O_2 parece ser um bom candidato para explicar a maioria dos efeitos produzidos pelas ROS nos organismos já que este facilmente se difunde pelas membranas celulares. É formado pela redução do O_2 molecular por ação de enzimas como a xantina oxidase e a oxidase do ácido úrico ou por dismutação do anião superóxidos. A sua toxicidade pode ser direta ou indireta: de um modo direto, conduz à depleção do ATP, do glutatião reduzido (GSH) e do NADPH, induz o aumento citosólico de Ca^{2+} livre (ativando, consequentemente, vários processos metabólicos dependentes do cálcio) e ativa algumas polimerases, conduzindo à morte celular; de um modo indireto, devido à quebra da ligação do peróxido por meio da reação de *Fenton*, conduzindo à formação do radical hidroxilo. Por sua vez, este induz a degradação de macromoléculas: dos lípidos, devido à peroxidação lipídica, hidratos de carbono, devido à sua oxidação, proteínas, pela oxidação dos grupos tiol e ácidos nucleicos devido à quebra da sua cadeia (Matos e Fernandes, 2005).

A catalase é uma enzima antioxidante intracelular que se encontra localizada normalmente nos peroxissomas celulares, dado existirem aí inúmeras enzimas capazes de gerar peróxido de hidrogénio, protegendo as células da acumulação desta molécula, dismutando-a, formando H_2O e O_2 ou utilizando-a como um antioxidante. Segundo Halliwell & Gutteridge (*cit in* Matos e Fernandes, 2005) é possível encontrá-la também no plasma e Radi *et al.* (*cit in* Matos & Fernandes, 2005) encontraram-na na matriz mitocondrial do coração de ratos. Apesar de se encontrar bastante confinada, desempenha um papel importante na defesa contra o *stress* oxidativo dado que o H_2O_2 e, até há data, foram descritos dois modos de ação para a catalase: como dismutase ou como peroxidase (Matos & Fernandes, 2005; Schreibelt *et al.*, 2007).

Esta enzima é particularmente importante no caso do desenvolvimento de tolerância ao *stress* oxidativo celular por parte do corpo e a expressão desta no sistema nervoso central é demonstrada em todos os tipos de células, *in vitro* e *in vivo* (Schreibelt *et al.*, 2007).

2.2.3. Glutathione peroxidase (GPx)

A glutathione peroxidase é uma enzima presente em numerosos tecidos animais, catalisando a redução do peróxido de hidrogénio. A GPx não se encontra geralmente presente nas plantas superiores, ocorrendo apenas nas algas e fungos e bactérias. A redução do H_2O_2 nos eritrócitos, na presença de GSH e da glutathione peroxidase, está associada à oxidação da glucose-6-fosfato e do fosfogluconato, gerando o NADPH necessário à vida das pentoses-fosfato. Esta rota metabólica do H_2O_2 é responsável pela redução de muitos peróxidos orgânicos e, como tal, é importante na proteção dos lípidos das membranas contra a peroxidação (Johnsson *et al.*, 2012; Matos & Fernandes, 2005).

A família das GPxs oxida as moléculas de glutathione e foram identificados seis tipos diferentes nas células dos mamíferos. As GPx1 estão expressas, geralmente, no citosol e na matriz mitocondrial das células, a GPx2, GPx4, GPx5 e GPx6 em órgãos e tecidos específicos e a GPx3 nas glicoproteínas extracelulares. A GPx1, x2 e x3 são expressas em homotetrámeros enquanto a GPx4 é um monómero (Schreibelt *et al.*, 2007).

No cérebro, a atividade da GPx1 é mais alta do que a da catalase. Em adição, uma vez que a catalase é predominantemente expressa em peroxissomas e a GPx1 é encontrada no citosol e nas mitocôndrias, há maiores quantidades de superóxido formado e a GPx parece ser mais importante do que a catalase na remoção do peróxido de hidrogénio do sistema nervoso central. No entanto, como se encontra em grandes quantidades no fígado e no citosol, por exemplo, o H₂O₂ acaba por ser mais vezes removido pela catalase do que por estas. Tajouri *et al.* (*cit in* Schreibelt *et al.*, 2007) demonstrou que o aumento expressão do gene das GPx significa um aumento da desmielinização ativa em patologias neuronais. Em adição, em 1989, Guy *et al.* (*cit in* Schreibelt *et al.*, 2007) mostrou que a GPx reduz a perda da barreira hemato-encefálica, sugerindo que o tratamento com esta é benéfico na terapia de doenças neuroinflamatórias (Matos & Fernandes, 2005; Schreibelt *et al.*, 2007).

2.2.4. Glutathione redutase (GR)

A glutathione redutase é um flavoproteína existente em organismos procaríotas e eucariotas, nomeadamente nas células de mamíferos como os eritrócitos humanos, de suínos e nas células hepáticas de camundongos. Foi detectada pela primeira vez em 1930 e isolada posteriormente a partir de várias fontes. Quanto às suas funções, esta enzima está envolvida no *scavenging* do H₂O₂ nos cloroplastos bem como na proteção contra o *stress* oxidativo induzido, por exemplo, por eletrões que se perdem na cadeia da fotossíntese e por determinados gases oxidantes como o ozono. Nos animais, a sua ação é mais facilmente observada quando estes são expostos a drogas, pesticidas e compostos químicos capazes de gerar peróxidos (Johnsson *et al.*, 2012; Matos & Fernandes, 2005).

2.2.5. Glutathione S-transferase (GST)

A GST, glutathione S-transferase, é uma enzima que se encontra nas plantas, nos insetos e nos animais em geral. Nos mamíferos, a sua concentração é elevada em determinados tecidos como o fígado. A GST desempenha funções diversas a nível do metabolismo do etanol, dos metais pesados, de determinadas drogas e na redução de peróxidos (Johnsson *et al.*, 2012; Matos & Fernandes, 2005).

De facto, a conjugação da GST constitui o primeiro passo na desintoxicação dos xenobióticos e dos metabolitos. No entanto, verifica-se frequentemente que os produtos resultantes são mais tóxicos e causam mais danos (conjugação do GST com alguns hidrocarbonetos halogenados). Por outro lado, elevadas concentrações de xenobióticos podem diminuir a concentração hepática de GST, reduzindo e prejudicando a capacidade de defesa antioxidante do fígado (Matos & Fernandes, 2005).

2.3. Danos oxidativos no corpo humano

Como a extensa gama de defesas antioxidantes do corpo humano não é capaz de prevenir e reparar por completo as lesões que o stress oxidativo provoca nas biomoléculas, tecidos e fluidos de indivíduos saudáveis, são frequentemente apresentados níveis basais de produtos finais da peroxidação lipídica e da oxidação das proteínas. O DNA de indivíduos saudáveis contém também níveis de bases modificadas como a 8-oxo-desoxiguanosina (produto gerado pela reação com o radical hidroxilo), além de produtos gerados pela reação de bases com os aldeídos finais da peroxidação lipídica (Barbosa *et al.*, 2006).

Os danos provocados pelo stress oxidativo fazem, por isso, parte do mecanismo intermediário de patologias que envolvam isquemia, inflamação, trauma, morte celular, inativação enzimática, septicemia, resposta inflamatória sistémica, hepatites e insuficiência cardíaca e respiratória, entre outros (Barbosa *et al.*, 2006). As doenças neurodegenerativas são definidas, no geral, como a perda progressiva das populações celulares neuronais e a associação a agregados de proteínas depositados na massa cinzenta e branca do cérebro (Kalyanaraman, 2013). Evidências crescentes mostram que o *stress* oxidativo tem um papel na patofisiologia das mesmas, uma vez que foram encontradas alterações bioquímicas nas células neuronais de pacientes com este tipo de patologia (Bell e Moosmann, 2002; Kalyanaraman, 2013).

Os marcadores para o *stress* oxidativo foram detetados em concentrações aumentadas nos estudos clínicos que têm por base a análise do cérebro de pacientes e de modelos animais que mimetizam a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a esclerose

múltipla, assim como relatam níveis alterados da expressão de determinadas enzimas antioxidantes (Barbosa *et al.*, 2006; Behl & Moosmann, 2002).

3. Patologias neurodegenerativas e enzimas antioxidantes

3.1. Cérebro, neurónios e *stress* oxidativo

Os organismos vivos interagem com o meio ambiente visando manter um ambiente interno que favoreça a sobrevivência, o crescimento, a reprodução celular e, conseqüentemente, a manutenção do organismo. O oxigénio molecular obtido da atmosfera é vital para os organismos aeróbios mas as ROS formadas intracelularmente a partir deste ameaçam a integridade celular, podendo comprometer processos biológicos celulares importantes (Cerqueira *et al.*, 2007).

Como explicado anteriormente, o dano oxidativo pode manifestar-se de diferentes maneiras como afectando o DNA por oxidação dos nucleótidos, dimerização e, eventualmente, mutação durante o processo de replicação; modificação da função proteica, por alteração das estruturas e da função das enzimas ou, ainda, destruindo-as; afectando os lípidos das membranas, levando à sua oxidação, a disfunções e a lise celular (Behl & Moosmann, 2002). Estes efeitos tóxicos do O₂ são associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crónicas, inflamatórias e degenerativas (Cerqueira *et al.*, 2007).

Todos os tecidos humanos podem sofrer lesões oxidativas, mas o sistema nervoso central (SNC) é especialmente sensível à ação das ROS uma vez que (Barbosa *et al.*, 2006; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Pôrto, 2001; 27):

1. Apresenta uma capacidade reduzida de regeneração celular quando em comparação com os outros órgãos, uma vez que os neurónios do indivíduo adulto são células pós-mitóticas. Assim, a morte neuronal induzida por toxinas ou pelo processo natural de envelhecimento pode causar sérios comprometimentos ao SNC;
2. O cérebro consome cerca de 20% do total de O₂ inspirado, em repouso, por indivíduo adulto, para que possa manter o potencial de membrana e o fluxo de neurotransmissores. Tal significa que os neurónios dependem da

eficiência das mitocôndrias que, quando lesadas, entram num ciclo vicioso onde cada vez mais elétrons vazam da sua cadeia transportadora;

3. Os neurónios utilizam extensamente o glutamato como neurotransmissor. A morte celular ou as disfunções metabólicas podem causar aumento da quantidade deste, elevando a concentração de cálcio intracelular a níveis patológicos, resultando na num excesso de ativação das fosfolipases e do óxido nítrico e à produção elevada de óxido nítrico;
4. Os neurotransmissores são também oxidáveis. A dopamina reage com o O₂, gerando o anião radical superóxido, peróxido de hidrogénio e quinonas reativas que diminuem as reservas da enzima glutatona. A oxidação dos neurotransmissores é um dos principais mecanismos a gerarem peróxido de hidrogénio no cérebro;
5. No fluído do cérebro espinal, os iões de ferro estão na transferrina, a qual se encontra saturada. Uma lesão no cérebro resulta na libertação dos iões de ferro capazes de catalisar a formação do radical hidroxilo e a cascata de peroxidação;
6. Além disso, a eficiência do gene expressivo das enzimas antioxidantes, fruto de uma linha genética adaptativa, pode diminuir com a idade e tornar-se menos efectivo contra o dano oxidativo, sendo o cérebro o primeiro afectado uma vez que os antioxidantes exógenos têm dificuldades acrescidas em atravessar a barreira hemato-encefálica; contêm também baixos níveis de enzimas antioxidantes quando comparado com outros órgãos;

Com o envelhecimento da população mundial, parece prevalecer e até aumentar a incidência do número de patologias relacionadas com a idade e, uma vez que a etiologia das mesmas é quase desconhecida, não há ainda um tratamento que altere significativamente a progressão de qualquer uma dessas desordens (Esposito *et al.*, 2002; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001).

Apesar das fontes das ROS e das estruturas-alvo afectadas diferirem entre patologias neuronais, há efeitos comuns como (Behl & Moosmann, 2002):

1. Níveis aumentados de metabolitos oxidativos são encontrados em tecidos *post-mortem* de pacientes com doenças neurodegenerativas;
2. Reação compensatória de defesa ao *stress* oxidativo nas células nervosas afetadas faz com que a concentração de enzimas antioxidantes no cérebro esteja aumentada;
3. Distúrbios no metabolismo mitocondrial, com incremento da cascata de ROS e originando reações das cadeias respiratórias;

Patologias como a doença de Alzheimer (AD), a doença de Parkinson (PD), a esquizofrenia (E), a esclerose lateral amiotrófica (ALS) e a esclerose múltipla (EM), doenças degenerativas dos gânglios da base com atrofia sistêmica múltipla e degeneração supranuclear progressiva, são teorizadas como estando sob mediação dos radicais livres e do *stress* oxidativo (Esposito *et al.*, 2001; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Johnson, 2007; Pôrto, 2001). Apesar desta observação, ainda não é claro se o *stress* oxidativo inicia o processo de neurodegeneração ou se este é uma consequência derivado às cascatas patológicas (Kalyanaraman, 2013).

Dos factores de risco já identificados, a idade parece ser o elemento comum a todas elas. As enzimas antioxidantes mais comuns no cérebro incluem a Cu/Zn-SOD (SOD-1) e a Mn-SOD (SOD-2), que catalisam a conversão do oxigénio em peróxido de hidrogénio e posteriormente em água pela catalase ou pela glutathione peroxidase (GPx) (Esposito *et al.*, 2001; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001), estando provado que o avançar da idade leva a uma diminuição da eficácia *scavenger* destas (Esposito *et al.*, 2001; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001).

Os níveis de catalase no cérebro são reduzidos em todas as regiões (aproximadamente 11 unidades/mg proteína no cérebro contra 1300 unidades/mg proteína nos eritrócitos e no fígado), sendo um pouco mais elevada a concentração no hipotálamo e na substância negra do que no córtex ou no cerebelo (Barbosa *et al.*, 2006). Assim, todas as áreas do cérebro contêm enzimas antioxidantes CuZn-superóxido dismutase (SOD), Mn-SOD, glutathione peroxidase, glutathione reductase, tioredoxinas e tioredoxina reductase.

Antioxidantes de baixo peso molecular também são encontrados no cérebro: concentrações milimolares de GSH e concentrações de ascorbato maiores do que no plasma (Barbosa *et al.*, 2006; Johnson, 2007).

O tecido do SNC de modelos animais com esclerose múltipla, onde foi estudada a expressão da cascata Nrf2/ARE reguladora das enzimas antioxidantes, mostra que as ROS estão envolvidas na redução quimioatrativa de monócitos proteína-1 e na adesão vascular celular de moléculas-1, proteínas implicadas na patogénese da EM. O aumento da expressão de enzimas antioxidantes endógenas reflete-se no *stress* oxidativo e na ativação desta cascata nas patologias, funcionando como outro mecanismo de defesa contra a toxicidade celular ROS-mediada (Ribeiro *et al.*, 2005; Schreibelt *et al.*, 2007).

Como mecanismo de defesa cerebral, pode ser citado o facto de o endotélio dos vasos sanguíneos cerebrais ser muito menos permeável, fazendo da barreira hemato-encefálica um meio protector do mesmo (Barbosa *et al.*, 2006).

3.2. Patologias neurodegenerativas

3.2.1. Doença de Alzheimer

A forma mais comum de demência, a doença de Alzheimer, afeta aproximadamente 5,2 milhões de pessoas apenas nos EUA e cerca de 30 milhões por todo o mundo, sendo que se espera que este valor quadruplique em 2050. Em Portugal, em 2011, estavam registados 110 mil casos. Esta doença pode ser hereditária ou não, tendo sido descoberta por Alois Alzheimer em 1907 e o seu diagnóstico só pode ser realizado, com certeza, após a morte do portador (Nicholls e Budd, 2000; Reed, 2011). Os sintomas mais comuns são a disfunção da memória, perda do léxico, desorientação temporal e espacial e dificuldade na orientação e, histopatologicamente, observa-se a perda de sinapses neuronais, a deposição da proteína β -amilóide extracelular e a precipitação intraneuronal de aglomerados neurofibrósos (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Sompol *et al.*, 2008). Os sintomas podem surgir a partir da quarta ou quinta década de vida, mas é mais comum a partir dos sessenta anos (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Ricciarelli *et al.*, 2007; Sompol *et al.*, 2008).

É uma desordem neurodegenerativa e, embora a sua etiologia não seja totalmente conhecida, pensa-se que pode ser despoletada pela mutação de proteínas precursoras de β -amilóides (APP) em genes do cromossoma 21 ou do 14. Os péptidos produzidos pelo processamento destas proteínas causam neurodegeneração e interrompem a função cognitiva através de diversos mecanismos, incluindo o *stress* oxidativo e a cascata de radicais livres no cérebro (Schrag *et al.*, 2013; Sompol *et al.*, 2008).

O mecanismo da patogénese é desconhecido mas é dada uma particular atenção à perda massiva do neurotransmissor acetilcolina e à possível implicação do *stress* oxidativo neste desenvolvimento, achando-se que servem de iniciadores por alterações do sinal mitótico e são cruciais para a sua propagação. Marcadores de oxidação são encontrados no córtex de pacientes portadores da mesma, principalmente no DNA mitocondrial devido à sua susceptibilidade. Estes factos demonstram que os pacientes que desenvolvem Alzheimer têm uma atividade antioxidante enzimática inadequada e uma hiperprodução de radicais livres (Ricciarelli *et al.*, 2007; Sompol *et al.*, 2008).

A doença de Alzheimer manifesta-se por uma perda patológica das sinapses, dos neurónios e a formação de ligações fibrosas neuronais e depósitos extracelulares de β -amilóide. Os pacientes com a patologia exibem uma dramática redução da cascata Nrf2, havendo a hipótese de que o decréscimo na expressão desta cascata e das enzimas fase II possam ser a etiologia da patologia. Para que esta hipótese seja estudada, a ativação e a expressão deste factor deve ser observado nos estágios iniciais da doença (Valko *et al.*, 2007). Estudos recentes investigam o papel da Nrf2/ARE e os seus potenciais valores terapêuticos para os modelos da doença de Alzheimer (Valko *et al.*, 2007; Torrão, 2012).

A teoria do *stress* oxidativo nesta patologia é uma analogia da teoria do envelhecimento celular causado por radicais livres, associando-se a aspectos de degeneração num largo espectro de doenças como o cancro, a falha cardiovascular e as desordens neurodegenerativas. A neurotoxicidade da deposição de amilóides, em vários tamanhos de cadeia de aminoácidos, foi encontrada em tecido de pacientes com doença de Alzheimer, *post-mortem*. Estudos mostram que existem sinais de *stress* oxidativo entre as manifestações iniciais da doença de Alzheimer e que o local de maior aumento da

falta de balanço oxidativo é no citoplasma de neurónios vulneráveis (Ricciarelli *et al.*, 2007; Sompol *et al.*, 2008; Torrão, 2012).

Este dano oxidativo pode ainda ser observado através do conteúdo carbonilo proteico elevado em pacientes com Alzheimer ou do marcador mais consistente da oxidação do DNA, o 8-hidroxi-2'-dioxiguanosina, elevado em pacientes com doenças neurodegenerativas (Esposito *et al.*, 2002) ou a ativação do fator transcriptional nuclear fator-kappa B (NF- κ B) que pode ser ativado pelas segundas mensagens da resposta mediadora intracelular das ROS e que pode influenciar a expressão de um largo número de genes, incluindo o SOD-2, e a expressão das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) e Bcl-2 (Esposito *et al.*, 2002; Ricciarelli *et al.*, 2007).

O cérebro do paciente com doença de Alzheimer mostra um extenso dano oxidativo associado à acumulação de péptidos amilóides, o principal constituinte das placas cerebrais, assim como à deposição de neurofibrases no cérebro. As evidências que suportam o aumento do stress oxidativo no cérebro incluem: 1) o aumento de alguns iões como o ferro; 2) aumento da peroxidação lipídica e diminuição do conteúdo de ácidos gordos poliinsaturados e o aumento 4-hidroxinonenal; 3) aumento das proteínas e da oxidação de DNA; 4) diminuição da energia metabólica (Pôrto, 2001; Valko *et al.*, 2007).

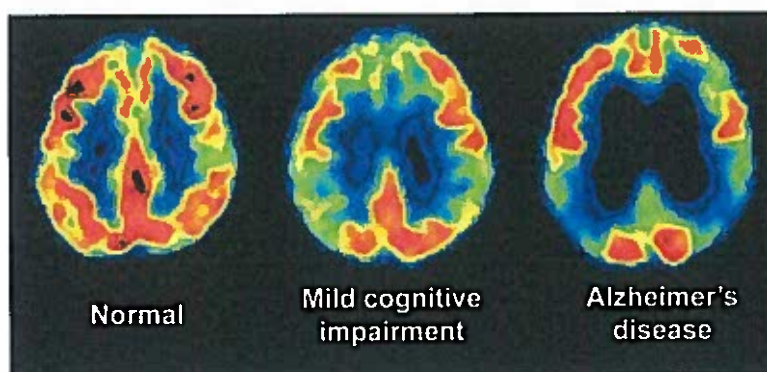


Figura 9 – Comparação de um cérebro normal e de um paciente com doença de Alzheimer.

Adaptado de Torrão, 2012.

O papel da MnSOD é essencial na sobrevivência das células neuronais, uma vez que os modelos animais mostram que camundongos nascidos sem a mesma morrem pouco tempo depois e com severas patologias neurológicas. Os pacientes que sofrem de Alzheimer parecem apresentar um declínio tanto desta enzima como da Cu/Zn-SOD nas regiões cerebrais, validando a teoria do stress oxidativo como uma das suas causas etiológicas (Sompol *et al.*, 2008). O estudo de Sompol *et al.* (2008) demonstra ainda que os neurónios pouco maduros apresentam menos capacidade de produção da enzima e que esta resposta adaptativa deficitária faz com que alguns sistemas não se previnam devidamente contra a doença de Alzheimer (Esposito *et al.*, 2002; Sompol *et al.*, 2008).

Nove estudos reunidos por Schrag *et al.* (2013) analisam a atividade da glutathione peroxidase, tanto no plasma como nos eritrócitos, mas não encontram uma associação significativa entre a doença de Alzheimer e estes, mesmo em estados iniciais da patologia, tal como o ocorrido com a glutathione reductase noutros seis estudos e o mesmo acontecendo com a catalase (Schrag *et al.*, 2013). Na análise do estudo de Schrag *et al.* (2013), as evidências do aumento do *stress* oxidativo no sangue, nos eritrócitos e nos linfócitos circulantes na doença de Alzheimer são particularmente importantes nos lípidos talvez pelo défice de *scavengers* de radicais livres, embora não parecesse existir nenhuma evidência de alterações nos antioxidantes enzimáticos do sangue (Schrag *et al.*, 2013).

Os resultados do estudo de Sompol *et al.* (2008) demonstram que os neurónios adaptam-se inicialmente ao *stress* oxidativo, com o aumento da sua defesa antioxidante enzimática. A prevenção do declínio do sistema de defesa antioxidante pode promover o desenvolvimento de uma intervenção eficaz antes de despoletar a doença neurodegenerativa, mesmo que esta esteja associada ao processo de envelhecimento. O estudo de Sompol *et al.* (2008) atesta ainda que a altura para começar o aumento do sistema antioxidante para proteção do SNC do *stress* oxidativo deverá começar antes do primeiro ano de vida. Este aumento deverá continuar na infância e estádios de idades posteriores para que o cérebro alcance uma proteção eficaz contra as doenças degenerativas neuronais causadas por *stress* oxidativo (Sompol *et al.*, 2008).

A terapia da doença de Alzheimer é, atualmente, quase exclusivamente efetuada baseando-se em hipóteses existindo apenas um número limitado de drogas utilizadas na estabilização das sinapses que mantêm a neurotransmissão. Muitos autores defendem que as terapias poderiam passar para alvos como a formação, deposição e função da amilóide do tecido nervoso, através dos seguintes processos (Behl e Mossmann, 2002; Esposito *et al.*, 2002):

- vacinação – imunização com indutores da amilóide levaria a uma resposta do sistema imune que levaria a uma prevenção da formação dos agregados;
- segregação de inibidores – baseado no conhecimento de detalhes do processamento de APP, incluindo a clonagem das enzimas responsáveis pelo aparecimento amilóide;
- drogas anti-inflamatórias – existe uma reação inflamatória forte no cérebro com doença de Alzheimer e pacientes com terapia crónica de anti-inflamatórios parecem ter um risco diminuído de desenvolverem doenças neurodegenerativas;
- uma vez que o stress oxidativo é uma das características das doenças neurodegenerativas, pensa-se que uma terapia antioxidante pode contribuir para a diminuição da patogénese e progressão da doença de Alzheimer e para a sua prevenção.

3.2.2. Doença de Parkinson

A segunda forma mais conhecida de demência, primeiramente descrita como “espasmo trémulo”, foi descoberta por James Parkinson, em 1817, depois de observar vários pacientes com características de sintomas semelhantes e afecta, actualmente, cerca de 1 a 2% da população com mais de 60 anos. Caracteriza-se pelo declínio da função motora, pelo tremor e por rigidez muscular, sendo estas atribuídas a agregados proteicos que alteram a função mitocondrial e a formação de veículos de sinapse, que degeneram (Cassarino e Bennett, 2000; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Reed, 2011; Torrão *et al.*, 2012).

A doença de Parkinson é uma desordem incurável, caracterizada histologicamente pela perda progressiva e irreversível de neurónios dopaminérgicos da substância negra e pela deposição de corpos de *Lewy* em algumas partes do cérebro (Nicholls e Budd, 2000; Reed, 2011, Valko *et al.*). O mecanismo de morte celular envolvido nesta patologia não se encontra totalmente desvendado, mas o stress oxidativo aumentado e a função mitocondrial alterada são considerados os iniciadores e mediadores do dano neuronal (Behl e Mossmann, 2000; Cassarino e Bennett, 2000; Esposito *et al.*, 2002; Ricciarelli *et al.*, 2007; Torrão *et al.*, 2012).

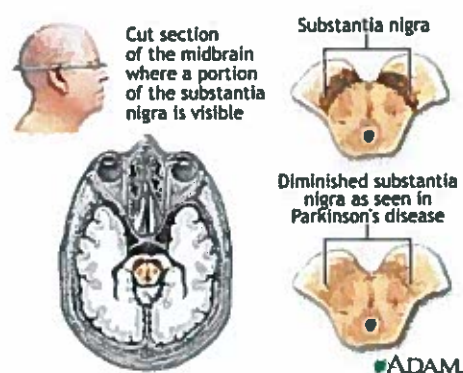


Figura 10 – Observação da matéria negra de um cérebro pertencente a um paciente com doença de Parkinson. Adaptado de Torrão (2012).

A evidência do envolvimento de radicais livres e do papel do stress oxidativo nestes pacientes pode ser observada pela oxidação da dopamina, na formação excessiva de peróxido de hidrogénio, de aniões superóxido e de hidroxirradicais, com toxicidade seletiva para a substância negra, induzindo sintomas semelhantes aos da doença de Parkinson em primatas. Tal como noutras patologias neurodegenerativas, a cascata molecular da doença de Parkinson foi encontrada nas células musculares dos pacientes (Ricciarelli *et al.*, 2007). Migliore *et al.* (*cit in* Esposito *et al.*, 2002) depararam-se, em pacientes sem tratamento, com o aumento do dano no DNA primário e do dano oxidativo em linfócitos periféricos, assim como marcadores de peroxidação lipídica e oxidação lipo-proteica no plasma destes.

Há marcadores do stress oxidativo como o 8-hidroxi-2_-desoxiguanosina e da peroxidação lipídica em níveis aumentados, assim como modificações nos antioxidantes existentes na substância negra. Segundo o estudo de Pôrto (2001), a glutatona

peroxidase é encontrada em concentrações abaixo do normal e as concentrações de Cu-ZnSOD e de MnSOD estão acima do normal, mas é interessante que tenha sido observado valores iguais das cascata que ativa a síntese da glutathiona. No entanto, nenhum destes dados indica com precisão se o stress oxidativo é um evento primário ou secundário (Cassarino e Bennett, 2000; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Pôrto, 2001; Ricciarelli *et al.*, 2007).

Por outro lado, estudos *post-mortem* em pacientes com doença de Parkinson (*cit in* Nicholls e Budd, 2000; Valko *et al.*, 2007) revelam que a Nrf2 expressa-se em níveis mais elevados na substância negra dos neurónios e que esta observação pode derivar de uma tentativa compensatória da defesa antioxidante como resposta à toxicidade oxidativa (Esposito *et al.*, 2002; Ricciarelli *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007).

3.2.3. Esquizofrenia

As atividades periféricas de enzimas antioxidantes bem como outros índices de peroxidação lipídica no plasma, hemácias e líquido cefalorraquiano, podem estar anormais em pacientes esquizofrénicos, segundo artigos encontrados na literatura. Acredita-se que a atividade enzimática antioxidante esteja associada à deterioração observada desde a infância até à adolescência. Para além disso, a desregulação metabólica dos radicais livres, também relacionada com a atividade antioxidante alterada, associa-se à discinesia tardia, aos sintomas negativos e aos sinais neurológicos, bem como às anormalidades tomográficas. Aqui também existem estudos elucidativos sobre o papel exercido pelos radicais livres/antioxidantes nos doentes com esquizofrenia (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Pôrto, 2001).

É evidente que um excesso na produção de radicais livres e o stress oxidativo estão envolvidos na fisiopatologia dos pacientes com esquizofrenia. Níveis elevados de SODs são constantemente encontrados em pacientes com esta patologia crónica (Zhang *et al.*, 2006). Além disso, altos níveis de produtos decorrentes de peroxidação lipídica são detetados no plasma, no sangue e no líquido cefalorraquidiano de pacientes esquizofrénicos, apesar das discrepâncias encontradas nos estudos sobre as enzimas antioxidantes e os produtos da peroxidação lipídica (Zhang *et al.*, 2006).

Alterações nas enzimas antioxidantes ou na peroxidação lipídica estão associadas a uma alteração dos sintomas. O uso de antioxidantes, como as vitaminas, extrato de *Gingko biloba* ou de ácidos gordos polinsaturados melhora alguns dos sintomas psicopatológicos dos pacientes mostrando que os radicais livres se encontram envolvidos no desenvolvimento da patologia (Zhang *et al.*, 2006).



Figura 11 – Alterações no cérebro com esquizofrenia. Adaptado de Wikia (2013).

Verificou-se que os níveis de SOD encontram-se aumentados, os da catalase diminuídos e os das GSH-Px parecem não sofrer alterações em casos de esquizofrenia crônica, quando tratados com antipsicóticos típicos (Zhang *et al.*, 2006). O mesmo grupo de investigadores, mais tarde, reportou baixos níveis de SOD e poucas alterações nos níveis de catalase e GSH-Px em pacientes com o primeiro episódio de esquizofrenia e que nunca haviam sido medicados antes. Os resultados sugerem que os tratamentos com antipsicóticos podem aumentar as SOD e decrescer as concentrações de catalase mas não de GSH-Px. Recentemente, Yao *et al.* (*cit in* Zhang *et al.*, 2006) reportaram

atividades altas de SOD e GSH-Px em pacientes esquizofrênicos que não eram tratados com medicação. Mais recentemente, Akyol *et al.* (cit in Zhang *et al.*, 2006) reportaram níveis de SOD reduzidos no plasma em pacientes com doses muito altas de neurolépticos. O recente estudo de Zhang *et al.* (2006) mostra uma diminuição significativa nas quantidades iniciais de SOD no sangue em pacientes tratados com o antipsicótico atípico risperidona, uma alteração que pode estar associada à diminuição dos sintomas negativos. Ranjekar *et al.* (cit in Zhang *et al.*, 2006) também reporta uma significativa diminuição das três enzimas antioxidantes de defesa (SOD, catalase e GSH-Px) em pacientes esquizofrênicos predominantemente tratados com antipsicóticos atípicos. Assim, pensa-se que o efeito dos agentes antipsicóticos nas enzimas antioxidantes merece um estudo mais aprofundado uma vez que a verdadeira alteração das enzimas antioxidantes pelos diferentes medicamentos da patologia é ainda desconhecida (Cassarino e Bennett, 2000; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006).

3.2.4. Esclerose lateral amiotrófica

A esclerose lateral amiotrófica é uma doença neurodegenerativa progressiva fatal de causa desconhecida que leva à perda dos movimentos num período entre 1 e 5 anos causada pela perda progressiva de neurónios motores no córtex cerebral. A sua incidência mundial ronda os 1.8/100.000 pessoas, com uma predominância no género masculino (Esposito *et al.*, 2002; Ricciarelli *et al.*, 2007).

Esta doença foi descoberta em 1869 por Jean-Martin Charcot e tem um progresso muito rápido após a descoberta dos sintomas que pode levar à morte. Pode ser hereditária ou não, o que ocorre em 95% dos casos, e caracteriza-se pela atrofia muscular, perda de força e espasmos. Vinte por cento dos portadores da patologia apresentam uma mutação na enzima antioxidante superóxido dismutase, o que leva a toxicidade celular, já que reduz a habilidade de reduzir os radicais livres, induzindo altos níveis de peroxidação lipídica (Esposito *et al.*, 2002; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Reed, 2011; Ricciarelli *et al.*, 2007).

A evidência mais convincente da atividade das ROS na patogênese da neurodegeneração veio da análise da esclerose lateral amiotrófica familiar (ELAF), com defeitos no gene SOD1 responsável pela codificação de Cu-ZnSOD ou das SOD citoplasmáticas. A super-expressão do gene SOD1 humano causa stress oxidativo e consequente lesão neuronal para, finalmente, levar a mudanças degenerativas (Esposito *et al.*, 2002; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Pôrto, 2001).

Várias drogas redutoras de ROS têm sido utilizadas como agentes potencialmente terapêuticos em camundongos transgênicos que expressam uma mutação no gene humano da enzima SOD1 (Esposito *et al.*, 2002).

3.2.5. Esclerose múltipla

A esclerose múltipla é uma doença auto-imune inflamatória crônica do SNC, com lesões tipicamente localizadas na matéria branca do cérebro e, embora seja considerada multifatorial, ainda não foi totalmente identificada a sua etiologia. No entanto, aceita-se que a proliferação de células inflamatórias, como as células T, no SNC, dano nos oligodendrócitos e nos axônios via neuroinflamação e stress oxidativo possam estar envolvidos no início e progressão da doença (Valko *et al.*, 2007).

A desmielinização que os portadores desta patologia sofrem acarreta uma variedade de sintomas clínicos, incluindo alterações na sensação, problemas visuais, fraqueza muscular e dificuldade de coordenação e de falar. O exame macroscópico do tecido do SNC de pacientes com esclerose múltipla revela placas demarcadas na matéria branca que, patologicamente, atravessam a barreira hemato-encefálica, destruindo a mielina e levando à morte celular, verificando-se, ainda, perda axonal, formação de cicatrizes fibrosas e presença de infiltrados inflamatórios que consistem quase todos em linfócitos e macrófagos (Schreibelt *et al.*, 2007).

Pensa-se que os macrófagos têm um papel central na esclerose múltipla embora se especule que esta possa ser uma doença vascular. Para além disso, durante a inflamação, os macrófagos produzem uma variedade de mediadores inflamatórios como as

citoquinas, quimiocinas, óxido nítrico e espécies oxigénio-reativas (ROS) que contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença (Schreibelt *et al.*, 2007).

Pacientes com lesões por esclerose múltipla apresentam nos estudos efetuados ao seu soro, vários marcadores do dano oxidativo como a concentração reduzida de diversas enzimas antioxidantes (Schreibelt *et al.*, 2007), sugerindo que os altos níveis de espécies oxigénio-reativas podem resultar em depleção dos antioxidantes celulares nestes pacientes.

Aparentemente, estas espécies e o *stress* oxidativo contribuem para a formação e persistência das lesões da esclerose múltipla, já que na sua fase inicial de formação as ROS produzidas podem induzir a migração de leucócitos (Schreibelt *et al.*, 2007). As *scavengers* das ROS podem interferir a diversos níveis durante a formação da lesão da esclerose múltipla, esperando-se que a terapia com antioxidantes possa ser benéfica nestes pacientes (Schreibelt *et al.*, 2007). No entanto, parecem existir vários reveses no uso dos antioxidantes exógenos no tratamento desta doença, uma vez que a maioria não atravessa corretamente a barreira hemato-encefálica, são muito instáveis no corpo humano e altas doses são geralmente requisitadas para alcançar efeitos positivos, sendo por isso necessária a maior estimulação dos antioxidantes endógenos (Schreibelt *et al.*, 2007).

Esta patologia pode ser iniciada pela ativação anormal de células T CD4+ expostas a péptidos antigénicos na periferia que atravessam a barreira hemato-encefálica, resultando numa série de efeitos tóxicos, ativação excessiva dos macrófagos, células da microglia e astrócitos, gerando ROS e promovendo lesões diretas nos tecidos. É interessante que o Nrf2 pode modular as respostas da neuroinflamação auto-imune em modelos de esclerose múltipla. Modelos animais com défice de Nrf2 exibem uma expressão aumentada de enzimas inflamatórias, citoquinas e quimiocinas além de serem altamente sensíveis a neuroinflamações e demonstram um aumento da infiltração na microglia e nos mediadores da expressão inflamatória. Tecidos *post-mortem* de pacientes diagnosticados com esclerose múltipla mostram as mesmas características (Pôrto, 2001).

Pensa-se que a atividade das enzimas antioxidante pode ter um papel importante de proteção na patogênese da esclerose múltipla em níveis distintos (Figura 12) (Schreibelt *et al.*, 2007):

- 1) enzimas antioxidantes podem ter um efeito *scavenger* diretamente nos produtos dos radicais livres, restaurando a integridade da barreira hemato-encefálica reduzindo a migração dos leucócitos;
- 2) o aumento dos níveis das enzimas redox pode inibir a fagocitose da mielina;
- 3) a regulação destas enzimas previne o dano axonal das ROS.

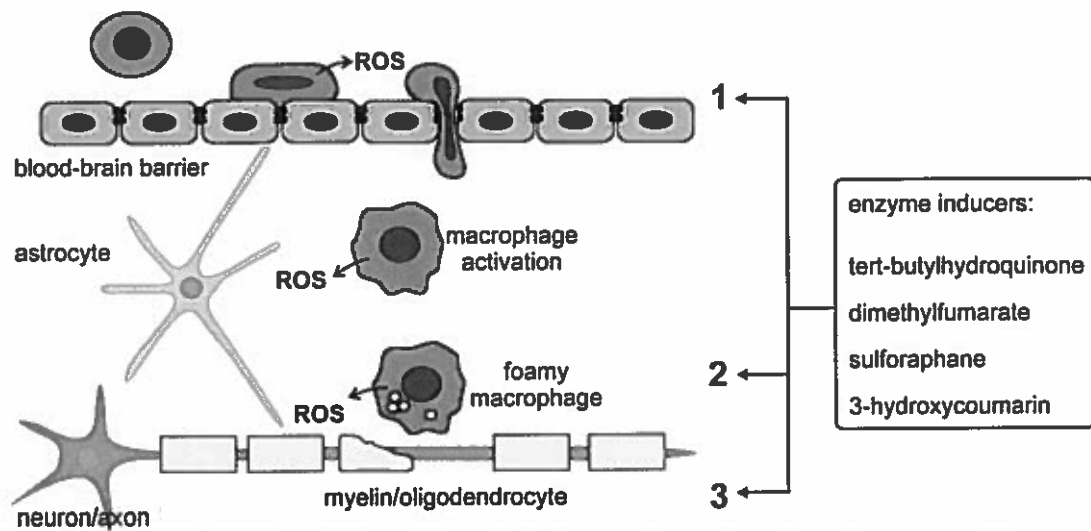


Figura 12 – Expressão das enzimas antioxidantes na proteção da patogênese da EM por 1) proteção da integridade da barreira hemato-encefálica e redução da migração de leucócitos, 2) inibição do dano na mielina e fagocitose e 3) prevenção do dano axonal induzido pelas ROS. Adaptado de Schreibelt *et al.* (2007).

Capítulo III – Conclusão

O aparecimento das espécies oxigénio-reativas (ROS) é uma condição fisiológica associada à vida aeróbia e ao organismo humano, resultando do metabolismo natural celular. Simultaneamente, este apresenta mecanismos intrínsecos e extrínsecos para manter a concentração das ROS nos limites fisiológicos, já que estas estão envolvidas em processos fisiológicos, como mediadores secundários da sinalização, em mecanismos de ajuste celular, de defesa celular, de proliferação e morte celular.

Um desequilíbrio no balanço oxidativo leva ao estímulo de algumas vias intracelulares podendo levar a danos oxidativos que promove a peroxidação das PUFA nas membranas celulares, das proteínas e das bases nitrogenadas do DNA. Os danos promovidos pelas ROS nas células são combatidos por uma variedade de mecanismos de defesa antioxidante como as enzimas antioxidantes endógenas. No entanto, uma redução destas pode levar ao desencadeamento de algumas patologias, entre elas as doenças neurodegenerativas. A discussão se a neurodegeneração é uma causa direta das ROS ou se esta resulta da progressão da doença ainda é controversa pelo que são precisos mais estudos que demonstrem que a degeneração neuronal e o stress oxidativo estão intimamente ligados no início das patologias.

Patologias como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esquizofrenia ou esclerose múltipla têm em comum processos oxidativos e alterações decorrentes destes, com alterações nas enzimas antioxidantes ou nas suas cascatas, como na importante superóxido dismutase ou na catalase.

A expressão destas enzimas é ainda regulada pela cascata Nrf2/ARE, comum nas patologias observadas, sugerindo um dano contínuo causado por stress oxidativo e vários estudos mostram que a terapia antioxidante é benéfica *in vitro*. Mas, nos poucos modelos *in vivo* existentes, há uma evidência limitada do efeito neuroprotetor dos antioxidantes, sendo que os autores atribuem tal facto à necessidade da utilização de um “cocktail” de enzimas antioxidantes ao invés de apenas a combinação de duas, como é feito na maioria das vezes. No entanto, um dos entraves a este tipo de tratamento prende-se com o facto de, quando os sintomas surgem e a maioria das doenças

neurodegenerativas são diagnosticadas, já ocorreu uma considerável perda neuronal e este podem servir apenas para reduzir os sintomas das patologias. Poderá por isso ser interessante observar a intervenção antioxidante em idades mais novas.

Como tal, a indução do aparecimento de enzimas endógenas por ativadores do Nrf2/ARE pode ser interessante na aproximação dos níveis suficientes de antioxidantes para interferir com os processos patológicos das doenças neurodegenerativas como a migração de leucócitos e dano axonal. Estudos futuros devem providenciar mais dados sobre o valor da Nrf2/ARE indutoras de enzimas para o tratamento das doenças neuroinflamatórias. A utilização de um tratamento antioxidante baseia-se nas observações *in vitro*. Outra das limitações, não desenvolvido neste trabalho, é a limitação do conhecimento baixo que existe sobre a penetração da barreira hematoencefálica de diferentes antioxidantes sistémicos e, como tal, a utilização ou o estímulo da cascata de ativação das enzimas antioxidantes teriam mais impacto do que a administração de drogas com estas enzimas.

Capítulo IV – Bibliografia

- Barbosa, L., Medeiros, M., Augusto, O. (2006). Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes. *Química Nova*, 29 (6), pp. 1352-1360;
- Behl, C., Moosmann, B. (2002). Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radical Biology & Medicine*, 33 (2), pp.182-191;
- Cassarino, D., Bennett, J. (2000). An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses and cell death in neurodegeneration. *Brain Research Reviews*, 29, pp. 1- 25;
- Cerqueira, F., Medeiros, M., Augusto, O. (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, 30 (2), pp. 441-449;
- Cruz, M. *et al.* (2008). Enzimas em diagnósticos e medicamentos. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado, pp. 305-326;
- Esposito, E. *et al.* (2002). A review of specific dietary antioxidants and effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*, 23, pp. 719-735;
- Fogaça, J. (2013). Enzimas. [Em linha]. Adaptado de <<http://www.brasilecola.com/quimica/catalise-enzimatica.htm>>. [Consultado a 19.10.2013];
- Food Brasil (2011). Enzimas: natureza e ação nos alimentos. *Food Ingredients Brasil*, 16, pp. 26-38;

- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurogenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40, pp. 959-975;
- Johnson, J. (2007). The Nrf2-ARE pathway: a potential therapeutic target for neurodegenerative diseases. *International Congress Series*, 1302, pp. 143-153;
- Johnson, W., Wilson-Delfosse, A., Mieyal, J. (2012). Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrientes*, 4, pp. 1399-1440;
- Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical andgraduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*, 1, pp. 244-257;
- Kang, D., Kang, S. (2013). Targeting cellular antioxidant enzymes for treating atherosclerotic vascular disease. *Biomolecular Therapy*, 21 (2), pp. 89-96;
- Kezhar, D. (2012). Diabetes drug improve memory and learning in patients with Alzheimer's disease. [Em linha]. Adaptado de <http://medimoon.com/2012/11/diabetes-drug-improve-memory-and-learning-in-patients-with-alzheimers-disease/>. [Consultado a 21.10.2013];
- Kohen, R., Nyska, A. (2002). Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicology Pathology*, 30 (6), pp. 620-650;
- Matos, P. & Fernandes, A. (2005). Antioxidant defense in animals. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 12 (1), pp. 101-123;
- Messias, K. (2009). Os antioxidantes. *Food Ingredient Brasil*, 6, pp. 16-31;

- Mira, N. (2003). Enzimas catalizadoras de reações biológicas. [Em linha]. Adaptado de <<http://pt.scribd.com/doc/132143698/TEXTO-ENZIMOLOGIA>>. [Consultado a 13.9.2013];
- Nicholls, D., Budd, S. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiology Review*, 80, pp. 315-360;
- Olempska-Beer, Z. *et al.* (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45, pp. 144-158;
- Padgett, L. *et al.* (2013). The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Academy of Sciences*, 1821, pp. 16-35;
- Pôrto, W. (2001). Radicais livres e neurodegeneração. Entendimento fisiológico: base para novas terapias?. *Revista de Neurociências*, 9 (2), pp.71-76;
- Reed, T. (2011). Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, pp. 1302-1319;
- Ribeiro, S. *et al.* (2005). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigénio no meio biológico. *Bioscience Journal*, 21 (3), pp.133-149;
- Ricciarelli, R. *et al.* (2007). Vitamin E and neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 28, pp. 591-606;
- Schrag, M. *et al.* (2013). Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiology of Disease*, 59, pp. 100-110;

- Schreibelt, G. *et al.* (2007). Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Research Reviews*, 56, 322-330;
- Sompol, P. *et al.* (2008). A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience*, 153, pp. 120-130;
- Torrão, A. *et al.* (2012). Different approaches, one target: understanding cellular mechanisms of Parkinson's and Alzheimer's disease. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 34 (2), pp. 194-218;
- Valko, M. *et al.* (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, pp. 44-84;
- Wikia. (2013). Esquizofrenia. [Em linha]. Adaptado de <http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Esquizofrenia>. [Consultado a 20.09.2013];
- Zhang, X. *et al.* (2006). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophrenia Research*, 81, pp. 291-300;
- Zimmer, K. *et al.* (2009). Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato*, 10 (14), pp. 123-137;
- Zimmermann, A., Kirsten, V. (2008). Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. *Ciências da Saúde*, 9 (1), pp. 51-68;