



Centro Universitário de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO

KENYA CARLA CARDOSO SIMÕES

Brasília – 2003



Centro Universitário de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Bacharelado em Ciências Biológicas

PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO

KENYA CARLA CARDOSO SIMÕES

Monografia apresentada como requisito para a conclusão
do curso de Biologia do Centro Universitário de Brasília.

Orientação: Professora Élide Geralda Campos (UnB)
Professor Cláudio Henrique Cerri e Silva (UniCEUB)

Brasília –2003

Dedicatória

Dedico primeiramente essa monografia a Deus, por ter me dado força e me apoiado em todos os momentos difíceis. Aos meus pais, Celso e Amélia, por ter me ensinado a valorizar os estudos e por todo apoio incondicional. A minha vó que sempre se preocupou com meus estudos e com a minha vida. A minha irmã Keisy que me ajudou nesta monografia comprando um computador novo. Aos meus irmãos Mateus e Michael, pelas brincadeiras que tanto me fizeram rir nos momentos de angústia. Ao Rafael por ter agüentado todo o meu estresse e ter me ajudado muito para a conclusão desse trabalho. Ao meu padrasto Carlos e a minha madastra Mariazinha por serem pessoas maravilhosas. E principalmente a minha irmã Keli, que apesar de não estar mais presente entre nós, foi a primeira pessoa a me apoiar nessa caminhada através da Biologia e sempre estará presente no meu coração.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Élide Geralda Campos que apesar de não lecionar nessa instituição de ensino não mediu esforços para que eu pudesse terminar esse trabalho.

Ao meu orientador Cláudio Henrique Cerri e Silva, não somente por me orientar, mas por todo o conhecimento passado ao longo desse curso.

A minha grande amiga Fernanda, que conheci nesse curso e que sem a sua ajuda e a de seu marido Genival eu não teria entregado essa monografia.

A Daniella e a Andréia, por toda sua preocupação, apoio e amizade verdadeira.

A minha professora Betinha, por todos os momentos de alegria e de aprendizado.

Ao professor Marcelo Ximenes pela sua paciência e respeito por mim ao longo dessa disciplina.

A Dra Luzia Helena e ao meu professor Paulo Queiroz pelos momentos de apoio de compreensão.

Ao meu Tio Sérgio e a minha Tia Leda que sempre me ajudaram ao longo dessa caminhada.

A minha grande amiga Débora por ter compreendido o meu sumiço durante esse semestre.

E a todos que me ajudaram tornando esse momento real.

Resumo

O envelhecimento é um fenômeno que se desenvolve ao longo do tempo, dependente do declínio nas funções fisiológicas e que varia entre as espécies. Várias teorias têm sido propostas para explicar esse processo. Dentre essas teorias, Harman propôs que os radicais livres produzidos durante a respiração aeróbica causam danos oxidativos cumulativos em biomoléculas resultando em envelhecimento e morte. A mitocôndria tem um importante papel na produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e na destoxificação desses radicais através de defesas antioxidantes. Mais de 2% do oxigênio consumido pela cadeia transportadora de elétrons sofre redução eletrônica gerando radical superóxido e, subsequentemente, outras espécies reativas de oxigênio (EROS) como o H_2O_2 e o radical hidroxila. Quando as defesas antioxidantes são superadas pela geração de EROS, surgem diferentes formas de toxicidade, incluindo lipoperoxidação de membranas celulares, degradação de proteínas, inativação enzimática e dano no DNA. Dentre os fenômenos decorrentes da ação de EROS incluem-se a transição da permeabilidade mitocondrial (MPT), que é uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna. Os danos provocados por EROS podem ser diminuídos através da utilização de antioxidantes que podem ser enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase) ou não-enzimáticos (glutaciona, vitaminas E, C, A e carotenóides). O desequilíbrio entre a formação de fatores pró-oxidantes e antioxidantes gera um estado chamado estresse oxidativo. Além do sistema de defesa antioxidante, sistemas de reparo também protegem as biomoléculas contra danos oxidativos. Assim o mecanismo do estresse oxidativo é função de três fatores: produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e sistema de reparo de danos oxidativos. A interação desses três fatores pode desencadear o processo de envelhecimento através do estresse oxidativo.

Palavras chaves: mitocôndria, espécies reativas de oxigênio (EROS), estresse oxidativo, transição da permeabilidade mitocondrial (MPT) e antioxidantes.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Introdução	01
1. Teorias do Envelhecimento	04
2. Radicais livres e estresse oxidativo	06
2.1. Espécies reativas de Oxigênio (EROS)	07
3. Antioxidantes	10
3.1. Sistemas de defesas antioxidantes	11
3.2. Sistema enzimático	12
3.2.1. Superóxido dismutase.	12
3.2.2. Catalase	13
3.2.3. Glutationa peroxidase (GPx)	13
3.3. Sistema antioxidante não enzimático	14
3.3.1. Glutationa (GSH)	14
3.3.2. Acido ascórbico (Vitamina C)	15
3.3.3. Vitamina E	16
3.3.4. Carotenóides	18
4. Estresse Oxidativo	18
4.1. Evidências do estresse oxidativo	19
5. Alvos moleculares das espécies reativas de oxigênio	19
5.1. Danos a Lipídios	20
5.2. Danos a proteínas	22
5.2.1. Oxidação das cadeias laterais de aminoácidos	23
5.2.2. Oxidação da cadeia protéica	24
5.2.3. Fragmentação protéica	25
5.2.4. Geração de derivados carbonil das proteínas	26
5.2.5. Acúmulo de proteínas oxidadas	27
5.3. Dano ao DNA	29
5.4. Sistema de reparo do DNA	32
6. Mitocôndria e seu papel no estresse oxidativo.	33

6.1. Morfologia da mitocôndria.	33
6.2. Cadeia Transportadora de elétrons (CTE)	35
6.3. Geração de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria	39
6.4. Transição da permeabilidade mitocondrial e estresse oxidativo	41
6.5. Papel da Mitocôndria na apoptose durante o envelhecimento	43
6.6. A importância do Ca^{2+} , Pi e Fe	46
7. Síntese: Interação da geração de oxidantes, danos oxidativos e reparo	48
8. Restrição calórica.	49
9. Restrição calórica e seus efeitos no estado reduzido da célula	51
Conclusão	54
Bibliografia	55

Lista de Figuras

Figura 01. Reação de oxidação e redução da vitamina C.	Pág 16
Figura 02. Mecanismo de varredura de radicais livres centralizados no oxigênio (ROO [•]) pela vitamina E.	Pág 17
Figura 03. Representação esquemática da peroxidação lipídica.	Pág 21
Figura 04. S – Tiolação de proteínas e proteólise de proteínas oxidadas.	Pág 23
Figura 05. Radicais de oxigênio mediando a oxidação de proteínas.	Pág 24
Figura 06. Clivagem da cadeia polipeptídica pelo (a) caminho da diamida e (b) caminho da α amidação.	Pág 26
Figura 07. Formação de carbonils através da glicação, glicoxidação, e pela reação com produtos da peroxidação lipídica.	Pág 27
Figura 08. O acúmulo de proteínas oxidadas é dependente do balanço entre pró – oxidantes, antioxidantes e atividades proteolíticas.	Pág 29
Figura 09. Exemplos de modificações de bases em DNA de mamíferos causadas por oxidações.	Pág 30
Figura 10. À esquerda, desenho esquemático de uma mitocôndria, mostrando sua morfologia e alguns dos seus componentes. À direita, microscopia eletrônica mostrando também a morfologia mitocondrial.	Pág 33
Figura 11. Genoma mitocondrial humano.	Pág 34
Figura 12. Cadeia transportadora de elétrons.	Pág 36
Figura 13. Estados de oxidação do FMN e da coenzima Q.	Pág 40
Figura 14. Células em meio de cultura.	Pág 42
Figura 15. Mecanismos de produção/ destoxificação de ROS na matriz mitocondrial e suas relações com a geração de MPT.	Pág 43
Figura 16. Papel da mitocôndria no envelhecimento e em doenças degenerativas associadas ao envelhecimento.	Pág 45
Figura 17. O estresse oxidativo é uma função da geração de oxidantes, defesas antioxidantes e reparo do dano oxidativo.	Pág 48
Figura 18: Efeito da restrição calórica na produção de radicais livres na mitocôndria.	Pág 50

Lista de Tabelas

Tabela 01. Estimativa da meia vida das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Pág
09

Tabela 02. Estudos dos efeitos da restrição calórica na injúria oxidativa. Pág
51

Lista de Abreviaturas

A – adenina
ADP – adenosina difosfato
AIF – fator indutor de apoptose
AMP – adenosina monofosfato
ATP – adenosina trifosfato
BER – reparo por excisão de base
C – citosina
Ca²⁺ – íon cálcio
CAT – catalase
CO₂ – dióxido de carbono
CoQ – coenzima Q
CoQH₂ – coenzima Q reduzida
CoQ^{•-} – semiquinona
CTE – cadeia transportadora de elétrons
Cu⁺ – íon cobre
CuZnSOD – CuZn superóxido dismutase
DNA – ácido desoxirribonucléico
DHA – dehidroascorbato
e⁻ – elétron
ERN – espécies reativas de nitrogênio
EROS – espécies reativas de oxigênio
FAD – flavina adenina dinucleotídeo
Fe – ferro
Fe²⁺ – íon ferroso
Fe³⁺ – íon férrico
FMN – flavina mononucleotídeo
G - guanina
GPx – glutationala peroxidase
GR – glutationala redutase
GSH – glutationala
GSSH – glutationala reduzida
H⁺ – íon hidreto

H₂O₂ – peróxido de oxigênio
H₂O – água
HO• – radical hidroxila
HO₂• – radical hidroperoxil
K⁺ – íon potássio
LH – ácido graxo insaturado
LO• – radical alcoxila
LOO• – radical peroxila
LOOH hidroperóxidos lipidícos
RH – ácido graxo insaturado
RO• – radical alcoxila
ROO• – radical peroxila
ROOH hidroperóxidos lipidícos
Mg²⁺ – íon magnésio
MMR – reparo por pareamento incorreto
MnSOD – Mn superóxido dismutase
MPT – transição da permeabilidade mitocondrial
mtDNA – DNA mitocondrial
NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NER – reparo por excisão de nucleóides
NO• – radical óxido nítrico
NOS – NO sintase
O₂ – oxigênio
³O₂ – oxigênio triplete
¹O₂ – oxigênio singlete
O₂^{•-} – ânion superóxido
O₂²⁻ – ânion superperóxido
ONOO⁻ – peronitrito
8-oxog – 7,8-dihidro-8-oxoguanina
Pi – fósforo inorgânico

Q – ubiquinona (forma oxidada)

QH₂ – ubiquinol

RNA – ácido ribonucléico

rRNA – RNA ribossômico

SOD – superóxido dismutase

T – timina

TCR – reparo acoplado a transcrição

tRNA – RNA transportador

TPx – tioredoxina peroxidase

TR – tioredoxina redutase

TSH – tioredoxina

TSST – tioredoxina oxidada

UV – ultravioleta

Zn²⁺ – íon zinco

Introdução

O envelhecimento é um processo inevitável que acontece naturalmente durante a vida de um organismo. Nesse processo ocorre uma diminuição progressiva das funções fisiológicas e também na habilidade de responder a estresses ambientais, levando assim a um aumento na susceptibilidade a doenças (Troen, 2003). Obviamente contribuem para esse processo os fatores genéticos (predisponentes) e ambientais (desencadeantes) (Ferreira, 2003).

O estudo do envelhecimento, pela sua natureza multidisciplinar tem sido caracterizado por uma variedade de teorias, uma grande literatura e uma ausência do estabelecimento das causas primárias (Beckman & Ames, 1998).

Dentre as várias teorias, a que se destaca nesse trabalho é a teoria dos radicais livres. Essa teoria foi proposta por Harman a 45 anos atrás e a sua hipótese é que os radicais livres são os fatores principais envolvidos no processo do envelhecimento. O principal ponto dessa hipótese é que o envelhecimento é causado pelo acúmulo de radicais livres que causam danos oxidativos a várias moléculas nas células dos tecidos. Subseqüentemente, Harman redefiniu a hipótese e sugeriu que a mitocôndria é o principal alvo dos ataques dos radicais livres, o que leva ao envelhecimento. Nas últimas duas décadas, a teoria dos radicais livres tem sido examinada e tem ganhado suporte através de resultados obtidos em pesquisas em nível celular e molecular (Wei & Lee, 2002).

A expressão radical é muito antiga em química, tendo sido usada para designar grupos de elementos que mantinham sua identidade através de uma série de reações. Exemplos: radical metila, alcoila, sulfato, fosfato, etc. A expressão “radicais livres” tem outro sentido e define um átomo, ou grupo de átomos, com elétrons não pareados na última camada eletrônica. Essa condição lhes dá uma extrema capacidade oxidativa e, por isso, tem-se tentado modificar seu nome para espécies oxidativas (Ferreira, 2003).

O oxigênio é um composto essencial para os organismos aeróbicos, a sua redução incompleta dentro das células leva à formação de intermediários tóxicos de oxigênio, denominados espécies reativas de oxigênio (EROS), que na sua maior parte são radicais livres muito reativos que podem causar danos moleculares e alterar o estado redox do material genético da célula (Tuñón & Jiménez, 2002).

A principal fonte endógena formadora de espécies reativas de oxigênio (ROS) é a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (CTE) (Ferreira, 2003). Em torno de 2% do oxigênio consumido pela cadeia transportadora de elétrons sofre redução por um elétron derivado da forma semiquinona da coenzima Q, para gerar o radical superóxido e subsequentemente outras EROS como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Sob condições em que a geração de EROS mitocondrial é aumentada (como na presença de Ca^{2+}) essas EROS podem levar ao dano irreversível ao DNA mitocondrial e nuclear, lipídeos de membrana e proteínas, resultando em disfunção mitocondrial e morte celular (Kowaltowski & Vercesi, 1999).

Dentre as disfunções mitocondriais desencadeadas por EROS pode-se citar a transição da permeabilidade mitocondrial (MPT). Esse evento é uma permeabilização não seletiva da membrana interna que precede a morte celular (Kowaltowski *et al.*, 2001). Vale ressaltar que a morte celular é um dos eventos ligados ao processo do envelhecimento.

As EROS são capazes de interferir em vários processos biológicos, onde o dano causado está relacionado ao tipo da espécie reativa e à macromolécula atacada. Os principais alvos das espécies reativas são lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Ferreira, 2003).

Normalmente, os efeitos deletérios causados pelas EROS são neutralizados e controlados por um sistema de defesa antioxidante da célula, integrado por um grupo de enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutathione oxidase) ou vários compostos não enzimáticos (glutathione, vitaminas E, C, A e carotenóides) (Tuñón & Jiménez, 2002).

A função primária dos antioxidantes é reduzir a velocidade de iniciação e/ou propagação dos processos radiculares, suprimindo a geração de espécies reativas ou, eliminando-as, diminuindo, ou até inibindo o dano oxidativo a uma molécula alvo. Um antioxidante é então, qualquer substância que, mesmo quando presentes em baixas concentrações, comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrasa, significativamente, ou ainda evita, a oxidação deste substrato (Ferreira, 2003).

A eficácia do sistema de proteção fornecido pelas substâncias e enzimas antioxidantes é limitada e pode ser insuficiente em situações especiais. Nestas condições em que há um desequilíbrio entre a formação de fatores pró – oxidantes e a eficácia dos antioxidantes ocorre o estado de estresse oxidativo, que tem influência sobre o processo de envelhecimento (Tuñón & Jiménez, 2002).

Além do sistema de defesa antioxidante, um outro sistema protege as células contra a permanência do dano oxidativo. Esse é o chamado sistema de reparo de biomoléculas (por exemplo, o reparo por excisão de bases no DNA). Desse modo o mecanismo de estresse oxidativo é composto por três componentes que interagem entre si: geração de oxidantes, proteção de antioxidantes e reparo do dano oxidativo (Beckman & Ames, 1998).

Assim, o objetivo dessa monografia é descrever o papel do estresse oxidativo no envelhecimento, analisando os resultados obtidos em estudos com organismos específicos.

1. Teorias do Envelhecimento

O envelhecimento é um fenômeno multifatorial caracterizado pelo declínio nas funções fisiológicas, sendo que esse declínio depende do tempo e varia entre diferentes espécies (Mandavilli *et al.*, 2002). É um processo que envolve o corpo todo. Cada órgão independentemente perde sua função e o corpo se torna senescente. Sabe-se que os indivíduos envelhecem em diferentes proporções, porém o processo que controla a proporção na qual uma pessoa envelhece e como essa senescência afeta o desenvolvimento de doenças crônicas são pouco conhecidos (Harris, 2002). Assim, várias teorias têm sido propostas para explicar esse processo.

A teoria do programa do envelhecimento propõe que as células se reproduzem por um número de vezes finito e de modo programado e, então morrem. Se a reprodução celular for temporariamente interrompida e então reassumida, a reprodução continua até que o número estabelecido seja alcançado (Harris, 2002).

A teoria do erro propõe que o dano ambiental ao ácido desoxirribonucléico (DNA) resulta em erros no programa genético. Como consequência ocorre a formação de mutações, teratógenos e a produção de proteínas anormais (Harris, 2002). Os danos normalmente acumulam em nível suficiente para resultar em um declínio fisiológico associado ao envelhecimento. Por exemplo, exposições graduais à radiação ionizante diminuem a expectativa de vida (Troen, 2003).

A teoria celular relaciona o envelhecimento à criação de ligações cruzadas entre macromoléculas (Harris, 2002). Por exemplo, a matriz extracelular desempenha um importante papel na regulação da expressão gênica. Assim, a ligação cruzada de macromoléculas como o colágeno e elastina podem alterar esse processo (Troen, 2003).

Quase há um século atrás, foi notado que animais com altas taxas metabólicas, freqüentemente tinham curto período de vida. Essas observações levaram a formulação da “hipótese da taxa de vida” ou teoria do “desgaste” (Finkel & Holbrook, 2000). Essa teoria propõe que o ciclo de vida máximo em diferentes espécies está relacionado ao nível metabólico e ao tempo necessário para se alcançar à maturidade reprodutiva. Os insetos e brisaranhos, por exemplo, têm taxas de metabolismo extremamente altas e ciclos de vida curtos (Harris, 2002).

A teoria genética do envelhecimento assume que esse fenômeno é uma continuação do processo de desenvolvimento e diferenciação, e é uma seqüência de

eventos codificados pelo genoma. Em organismos como *Drosophila*, levedura, *Neurospora crassa* (fungo) e *Caenorhabditis elegans* (nematóide), tem sido descrita a presença de genes que regulam a expectativa de vida. Em adição, a redução da temperatura tem modulado uma ampla variedade desses genes. Neste mesmo nível, a restrição calórica tem reduzido a expressão de oncogenes, a velocidade de mutação e transformação, bem como conservado o potencial replicativo, todos esses fenômenos ligados à mudança de expressão de genes. Outro aspecto dessa teoria considera o encurtamento do telômero como o relógio molecular que dispara o processo de envelhecimento. Telômeros são estruturas encontradas no final dos cromossomos de células eucarióticas e sua presença permite a completa replicação do DNA cromossomal, além de proteger o final do cromossomo de danos. A enzima responsável pela geração dessas estruturas é a telomerase. Assim, grande atenção tem sido dada a essa enzima, uma vez que sua presença em células tumorais tem sido relacionada à inadequada replicação e crescimento das células (González *et al*, 2003).

A teoria de acúmulo de danos focaliza a explicação para o envelhecimento no acúmulo progressivo de danos, em função do reparo e manutenção serem menores do que os necessários para a sobrevivência indefinida. O erro de síntese e/ou a falha no reparo ou degradação de moléculas defeituosas seriam então os grandes responsáveis pela perda progressiva de função celular. Uma das teorias mais populares, erro-catástrofe, introduzida em 1963, sugeria que os erros na transcrição do RNA e sua tradução em proteína seriam responsáveis pelo acúmulo de proteínas alteradas não funcionais. Com a idade e com a elevada ocorrência, gerariam uma catástrofe de erros cuja consequência seria a perda completa da função. Atualmente, sabe-se que esta catástrofe não é apresentada com tamanha intensidade, mas que a idade traz consigo a redução da fidelidade de transcrição e tradução (González *et al*, 2003).

A primeira teoria do envolvimento de radicais livres no envelhecimento foi proposta por Denham Harman no século passado na década de 50 (Finkel e Holbrook, 2000). Essa teoria tinha como hipótese que os radicais livres produzidos durante a respiração aeróbica causam danos oxidativos cumulativos em proteínas, lipídios e DNA resultando em envelhecimento e morte (Mandavilli *et al.*, 2002).

A identificação da mitocôndria como o maior produtor de EROS levou a teoria mitocondrial do envelhecimento. Harman propôs que o DNA mitocondrial (mtDNA) é provavelmente alvo do ataque de EROS. Posteriormente Miquel *et al.*, (1980) sugeriram que o processo do envelhecimento é causado por ataques de EROS ao mtDNA,

causando danos. Esses danos são então incorporados ao mtDNA, diminuindo o funcionamento mitocondrial e resultando conseqüentemente em um decréscimo na produção de energia e morte celular (Mandavilli *et al.*, 2002).

Uma modificação da teoria dos radicais livres é a teoria do estresse oxidativo. A idéia central dessa hipótese é que a velocidade do envelhecimento está diretamente relacionada com o dano oxidativo molecular irreversível que se produz ao longo do tempo; o acúmulo progressivo do dano oxidativo, sem que seja reparado pela célula, faz com que a capacidade dos mecanismos homeostáticos para manter as ótimas condições fisiológicas necessárias para a sobrevivência sejam superados. Uma constatação chave dessa hipótese é que o processo de envelhecimento não pode ser reduzido, nem a vida média da espécie aumentada, sem a atenuação do dano originado pelo estresse oxidativo (Tuñón & Jiménez, 2002).

2. Radicais livres e estresse oxidativo

Considera-se como radical livre qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desempareados, sendo um elétron desempareado aquele que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. A presença de elétrons desempareados confere a essa espécie caráter paramagnético e na maior parte dos casos, grande reatividade e uma vida média curta (Llesuy, 2002). E essa condição lhes dá uma extrema capacidade oxidativa e, por isso, tem-se tentado modificar seu nome para “espécies oxidativas” (Ferreira, 2003).

Essas espécies originam-se, geralmente, de reações de quebra homolítica de ligações que ocorrem devido a cisão térmica, de todo tipo de radiação eletromagnética ou ainda por processos de oxidação e redução (Santos, 1998). Os radicais livres centrados em O₂ são gerados fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos. Por sua vez, ao metabolizar certos compostos exógenos ao organismo, também se pode gerar radicais livres distintos (Llesuy, 2002).

Reações de espécies radicalares com espécies não radicalares tem uma característica especial que é a amplificação da resposta de iniciação do evento através de reação em cadeia. Isso acontece porque uma reação de um radical com um não radical sempre forma outro radical (Fridovich, 1998).

Os radicais livres podem sofrer reações de três tipos principais: combinação e desproporção, que ocorrem entre duas espécies radicalares, e reações de transferência, onde um agente de transferência reage com um radical (Santos, 1998). As reações de radicais, usualmente, processam-se em seqüências, ou cadeias, nas quais distinguem-se três fases: 1) iniciação, quando se formam os radicais; 2) propagação, onde o número de radicais não muda e 3) terminação, que destrói os radicais e encerra a cadeia (Pryor, 1970).

2.1. Espécies reativas de Oxigênio (EROS)

Embora a redução do O_2 por 04 elétrons catalisada pela citocromo c oxidase seja quase sempre executada com grande rapidez e precisão, o O_2 é, algumas vezes, reduzido de modo parcial, produzindo espécies de oxigênio que facilmente reagem com uma variedade de componentes celulares (Voet *et al.*, 2002).

EROS é o termo freqüentemente usado pelos pesquisadores da área para designar não apenas os radicais de oxigênio, mas também algumas espécies não radicalares derivadas de O_2 e com ação oxidantes (Santos, 1998). Essas espécies reativas estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres.

A molécula de O_2 pode ser considerada como um birradical já que possui dois elétrons desemparelhados, cada um deles em orbital molecular p. Ambos os elétrons tem o mesmo número quântico de spin, podendo dizer que tem spins paralelos. Esta estrutura corresponde ao O_2 em estado fundamental também chamado de oxigênio triplete 3O_2 . O oxigênio é um bom agente oxidante, por tanto, ao oxidar um composto, se reduzirá por ganho de elétrons. Este ganho ocorrerá de um elétron por vez. Adiciona-se um elétron ao oxigênio em seu estado fundamental, e o produto obtido é o ânion superóxido. (O_2^-). A adição de outro elétron dará lugar a formação do ânion superperóxido (O_2^{2-}) que não é um radical livre dado que não possui elétrons desemparelhados. Em geral, em sistemas biológicos, a redução parcial do oxigênio por ganho de 02 elétrons dá lugar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por sua vez, se o O_2 ganha 04 elétrons, uma molécula de água será formada. A ligação O-O no peróxido de hidrogênio é relativamente frágil e pode ser quebrada dando lugar a formação do radical hidroxila, que é altamente reativo (Llesuy, 2002).

O H_2O_2 não é um radical livre, mas sim uma espécie reativa de oxigênio, uma vez que não possui elétrons desemparelhados no orbital externo. Suas propriedades são de grande importância no estudo de reações oxidativas, já que esse composto atravessa membranas facilmente, podendo atingir o interior de outras células e, até mesmo, o núcleo da célula no qual foi gerado, levando a formação de oxidantes mais potentes como o radical hidroxila (HO^\bullet) (Santos, 1998; Ferreira, 2003).

O radical hidroxila, como mencionado anteriormente, é uma das espécies químicas mais reativas que se conhece, ele tem a capacidade de retirar átomos de hidrogênio de moléculas biológicas, modificando suas funções. A velocidade de reação deste radical é muito alta, combinando-se praticamente com qualquer molécula, *in vivo*, assim que gerado, numa reação controlada pela velocidade de difusão do radical (Ferreira, 2003).

Outra espécie reativa importante, o óxido nítrico (NO^\bullet), um radical que não é muito reativo, teve seu papel biológico identificado no final da década de 80, como sendo o fator de relaxamento derivado do endotélio. O NO^\bullet é produzido em diversos tipos de células a partir de L-arginina (aminoácido), NADPH e O_2 pela enzima NO sintase (NOS). Atua como vasodilatador, neurotransmissor e pode estar envolvido na eliminação de parasitas por macrófagos em algumas espécies de mamíferos (Santos, 1998; Ferreira, 2003). A interação entre o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e NO^\bullet resulta em ONOO^- (peroxinitrito), que é um forte oxidante (Beckman & Ames, 1998).

Dada a sua alta reatividade, as espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERN) têm vida média curta (Ferreira, 2003), conforme a tabela a seguir.

Tabela 01: Estimativa da meia vida das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Ferreira, 2003).

Espécies Reativas de Oxigênio	Meia vida em segundos
HO [•] , radical hidroxila	10 ⁻⁹
RO [•] , radical alcoxila	10 ⁻⁶
1O ₂ , oxigênio singlete ¹	10 ⁻⁵
NO [•] radical óxido nítrico	1 a 10
ONOO ⁻ , peroxinitrito	0,5 a 1
ROO [•] , radical peroxila	7

1. Singlete é o oxigênio ativado por uma fonte energética qualquer (luz, por exemplo) e que inverte o “spin” do seu último elétron.

Além das reações envolvendo transferência de elétrons, um outro tipo de reação promove a produção de radicais de oxigênio, ou oxiradicais. São reações entre o radical carbônico e oxigênio molecular. Essa reação leva à formação de radicais peroxil e consiste em uma das reações da etapa de propagação da peroxidação lipídica que pode também formar os radicais hidroperóxidos lipídicos (ROOH) e radicais alcoxila (RO[•]) (Branchaud, 1999).

A natureza aleatória dos ataques realizados pelos radicais livres dificulta a caracterização de seus produtos de reação, mas todas as classes de moléculas biológicas são suscetíveis às lesões oxidativas causadas pelos radicais livres. As oxidações dos lipídeos poliinsaturados nas células rompem a estrutura das membranas biológicas, e as lesões oxidativas no DNA podem produzir mutações pontuais. A função enzimática também pode ser comprometida devido à reação dos radicais com a cadeia lateral dos aminoácidos. Como a mitocôndria é o principal sítio do metabolismo oxidativo das células, seus lipídeos, seu DNA e suas proteínas provavelmente sofrem maiores danos provocados pelos radicais livres (Voet *et al.*, 2002).

Existem vários sítios de geração de oxidantes, porém quatro deles tem atraído muita atenção: cadeia transportadora de elétrons (CTE) nas mitocôndrias, metabolismo de ácido graxos nos peroxissomos, citocromo P450 e as células fagocíticas (Beckman & Ames, 1998). Como dito anteriormente, a mitocôndria é o principal sítio de geração de espécies oxidativas, assim ela será discutida mais amplamente adiante.

O segundo sítio de geração de ROS é a β -oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos. A primeira reação da β -oxidação libera H_2O_2 como um de seus produtos. Os peroxissomos possuem altas concentrações de catalase, que catalisa a dismutação do H_2O_2 . Além disso, o H_2O_2 originado dos peroxissomos contribui significativamente para o estresse oxidativo no citosol sob circunstâncias normais (Beckman & Ames, 1998).

As enzimas microsossomais citocromo P450 metabolizam compostos xenobióticos, usualmente originados de plantas, através de reações univalentes de oxidação e redução. Embora essas reações tipicamente envolvam NADPH e um substrato inorgânico, algumas das inúmeras enzimas citocromo P450 reduzem O_2 para $O_2^{\cdot -}$ e podem causar estresse oxidativo. Um caminho alternativo para a citocromo P450 mediar a oxidação envolve um ciclo redox, em que o substrato aceita um elétron do citocromo P450 e depois o transfere para o oxigênio. Assim é possível que uma grande geração de $O_2^{\cdot -}$ pela citocromo P450 é o preço que os animais pagam por sua habilidade de destoxificar altas concentrações desses xenobióticos (Beckman & Ames, 1998).

As células fagocíticas atacam os patógenos com uma mistura de oxidantes e radicais livres incluindo $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , NO^{\cdot} e hipoclorito. Embora a grande geração de oxidantes pelas células imunes seja diferente da geração nos peroxissomos, mitocôndrias e citocromo P450, sendo um resultado da patogênese, isso é, apesar de tudo, uma consequência normal da imunidade (Beckman & Ames, 1998).

3. Antioxidantes

Para evitar danos causados pelas EROS, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, isto é, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres chamados de antioxidantes. Estes antioxidantes estão em permanente atividade no organismo, visto que a produção de energia no organismo é uma das principais causas da formação de radicais, necessitando estar presentes em quantidades suficientes para neutralização dos efeitos dos radicais livres normalmente produzidos. Quando esta equivalência não existe, dizemos que esta ocorrendo um estresse oxidativo (Renz, 2003).

3.1. Sistemas de defesas antioxidantes

Existem diferentes estratégias celulares de defesa contra os processos mediados pelas espécies reativas de oxigênio. Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos (Meneghini, 1987; Llesuy, 2002). Ainda conforme a ação sobre os radicais livres, o antioxidante pode ser denominado de “scavenger”, quando ele age transformando um radical livre em outro menos reativo, ou “quencher”, quando consegue neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação (Renz, 2003).

A função primária dos antioxidantes é reduzir a velocidade de iniciação e/ou de propagação dos processos radicalares, suprimindo a geração de espécies reativas ou, eliminando-as, diminuindo, ou até inibindo, o dano oxidativo a uma molécula alvo. Um antioxidante é então, qualquer substância que, mesmo quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrasa, significativamente, ou ainda evita, a oxidação deste substrato (Llesuy, 2002; Ferreira, 2003).

Segundo Beckman & Ames (1998), o sistema de defesa antioxidantes inclui: 01) enzimas “scavengers” como a SOD que acelera a dismutação do O_2^- em H_2O_2 , e a catalase e glutathione peroxidase (GPX) que convertem H_2O_2 em água; 02) moléculas “scavengers” hidrofílicas como o ascorbato e a glutathione (GSH); 03) “scavengers” lipofílicos como os tocoferóis, flavonóides, carotenóides e ubiquinol; 04) enzimas envolvidas na redução de moléculas antioxidantes (GSH redutase e dehidroascorbato redutase) ou responsáveis pela manutenção de proteínas com grupamentos tióis (tioredoxina redutase); e 05) a maquinaria celular que mantém o ambiente reduzido (glicose-6-fosfato desidrogenase, que regenera NADPH).

O balanço entre a produção de EROS e o sistema de defesa antioxidante determina o estado de estresse oxidativo. Como a MPT ocorre devido à presença de EROS, a atuação de tipos variados de antioxidantes pode proteger o início desse evento nas mitocôndrias (Finkel & Holbrook, 2000; Kowaltowski *et al.*, 2001).

3.2. Sistema enzimático

3.2.1. Superóxido dismutase.

Os radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) podem ser produzidos pela reação monoelétrica do O_2 durante a respiração celular. A protonação do radical superóxido produz o radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), que pode reagir espontaneamente com um outro radical superóxido para formar H_2O_2 (Stryer, 1996). Essas seqüências de reações (01) estão esquematizadas abaixo:



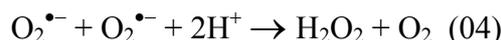
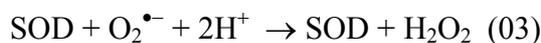
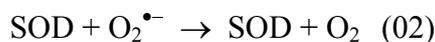
O radical superóxido pode ser eliminado pela superóxido dismutase, uma enzima presente em todos os organismos aeróbicos, que catalisa a conversão de dois desses radicais em H_2O e O_2 (Stryer, 1996).

A função da superóxido dismutase é de proteger os organismos aeróbicos contra os efeitos deletérios potenciais do superóxido. Essa enzima ocorre em diversos compartimentos celulares diferentes. A enzima citosólica é constituída de duas subunidades similares, cada uma contendo um equivalente de Cu^{2+} e um Zn^{2+} , enquanto a enzima mitocondrial contém Mn^{2+} , similar a enzima encontrada em bactérias. Estas observações apóiam a hipótese de que a mitocôndria evoluiu de um procarioto (Fridovich, 1998; Murray *et al.*, 2002).

Na SOD que contém Cu^{2+} e Zn^{2+} em seus sítios ativos, o Cu^{2+} sofre mudanças de valência durante o ciclo catalítico, formando Cu^{2+} e Cu^+ . Já o Zn^{2+} tem principalmente papel estrutural. Essa enzima não é só encontrada no citosol de células eucarióticas, CuZnSODs também foram encontradas no periplasma de bactérias gram-negativas, nos plastídios de plantas e no espaço extracelular de mamíferos (Fridovich, 1998).

A MnSOD é uma enzima tão ativa quanto as CuZnSODs. Ela é um homotetrâmero que é reduzido ao estado de oxidação III para II e depois é novamente oxidado a III (Llesuy, 2002). Ratos “knockout”, incapazes de produzir MnSOD mitocondrial, são severamente afetados pela ausência da enzima e morrem poucos dias após o nascimento. Os efeitos deletérios do “knockout” do gene da forma citosólica (CuZnSOD) são notáveis, porém, muito menos dramáticos (Fridovich, 1998).

A conversão de superóxidos em peróxido de hidrogênio (pela MnSOD e CuZnSOD) segue duas reações (02, 03, 04) parciais, como mostrado abaixo (Ferreira, 2002).



3.2.2. Catalase

A catalase é uma hemoproteína que contém quatro grupos heme. Além de possuir atividade peroxidásica, ela é capaz de utilizar uma molécula de H_2O_2 como um substrato doador de elétrons, e outra molécula de H_2O_2 como oxidante ou acceptor de elétrons (reação 05) (Murray *et al.*, 2002).



A atividade catalásica, nos tecidos animais e vegetais, encontra-se, predominantemente, em organelas subcelulares, circundadas por uma membrana simples conhecida como peroxissomas (Ferreira, 2003). Também pode ser encontrada na matriz mitocondrial (Kowaltowski *et al.*, 2001).

3.2.3. Glutathione peroxidase (GPx)

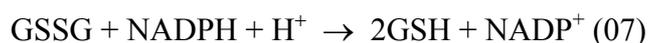
Além de ser um doador de elétrons, em mamíferos o H_2O_2 também pode ser detoxificado por outra enzima além da catalase, a glutathione peroxidase, que está localizada no citosol e na matriz mitocondrial (Llesuy, 2002).

A GPx é uma proteína contendo selênio com um absoluto requerimento por glutathione como substrato. Essa enzima catalisa a redução de hidroperóxidos, usando GSH como agente redutor (Ferreira, 2002).

Assim, a GPx catalisa a redução do H_2O_2 , com oxidação conjunta da glutathione reduzida como mostra a reação (06) (Ferreira, 2003).



A GSSG produzida pela atividade da glutathione peroxidase é, economicamente, recuperada pelas células na sua forma reduzida, através da atividade da glutathione reductase, que utiliza como poder redutor o NADPH produzido na via das pentoses-fosfato de acordo com a seguinte reação (07) (Llesuy, 2002; Ferreira, 2003).

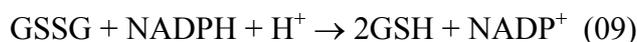
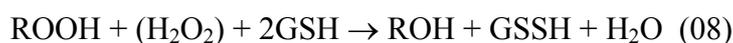


3.3. Sistema antioxidante não enzimático

A outra parte da defesa contra os agentes oxidativos é a defesa não enzimática. Antioxidantes não enzimáticos podem ser divididos em hidrossolúveis (glutathione, vitamina C, indóis, catecóis) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina A, vitamina E) (Renz, 2003).

3.3.1. Glutathione (GSH)

A glutathione é um tripeptídeo de ácido α -glutâmico, cisteína e glicina que atua como co-substrato da glutathione peroxidase. Uma alta concentração intracelular de GSH protege as células do ataque de EROS através de dois tipos de reações: 1ª) a GSH reage não enzimaticamente com radicais como o $\text{O}_2^{\bullet-}$, o NO^\bullet e o HO^\bullet ; 2ª) GSH também atua como doador de elétrons para a redução de peróxidos catalisada pela glutathione peroxidase (reações 08 e 09) (Llesuy, 2002). Além desses dois papéis, a GSH está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo de ácido ascórbico, manutenção da comunicação entre células e bloqueio da oxidação e ligação cruzada de grupos $-\text{SH}$ protéicos (Ferreira, 2003).



Esse tripeptídeo se localiza principalmente em fração citosólica, porém, em torno de 10% do conteúdo celular de GSH está compartimentalizado dentro das mitocôndrias. Como a mitocôndria também contém glutatona peroxidase, glutatona redutase e NADPH, um sistema completo para a detoxificação de hidroperóxidos se encontra presente no interior destas organelas (Llesuy, 2002).

3.3.2. Ácido ascórbico (Vitamina C)

A vitamina C, ácido ascórbico, um derivado da hexose, é sintetizada por vegetais e na maioria dos animais a partir da glicose e galactose. Os seres humanos, outros primatas, porquinhos-da-índia, alguns morcegos e algumas espécies de aves, entretanto, não possuem uma enzima, a l-glucolactona oxidase e desta forma não podem sintetizar o ácido ascórbico, o que para eles é, conseqüentemente, uma vitamina (Jr, 2002).

O ácido ascórbico puro é um sólido cristalino branco, muito solúvel em água, possuindo dois grupos – OH ionizáveis (Ferreira, 2003). Ele funciona em muitas funções metabólicas como um co-fator enzimático, um agente protetor e um reagente com transição de íons metálicos. Cada uma destas funções envolve as propriedades de redução – oxidação da vitamina (Jr, 2002).

O ácido ascórbico pode reagir com radicais livres o que o torna um antioxidante, pois ele é submetido à oxidação de um único elétron, ao radical ascorbil, que desproporciona ascorbato a dehidroascorbato (DHA) (figura 01). O radical ascorbil é relativamente não reativo e parece não ser capaz de reduzir O_2 a $O_2^{\bullet-}$. A baixa reatividade do ascorbil é a essência de muitos dos efeitos antioxidantes do ascorbato: um radical reativo interage com o ascorbato e uma espécie muito menos reativa (ascorbil) é formada. O radical ascorbil sofre uma reação específica, regenerando ascorbato e dehidroascorbato (reação 10) (Jr, 2002; Llesuy, 2002; Ferreira, 2003).

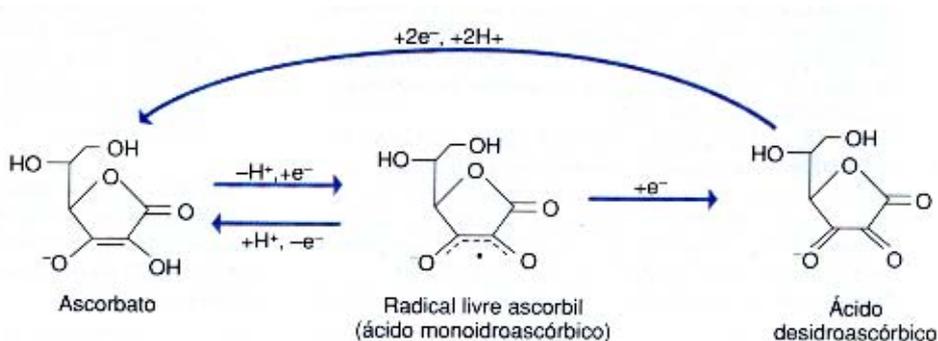


Figura 01: Reação de oxidação e redução da vitamina C. Fonte: Jr, 2002.



Dentre os processos de regeneração molecular dos quais participa o ácido ascórbico, talvez, o mais importante, seja a reciclagem do α -tocoferol (reação 11). Uma vez que o ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, não podendo entrar no interior das membranas hidrofóbicas, esse mecanismo pressupõe que o radical α -tocoferoxil possa mover-se para perto da superfície da membrana, para sua redução pelo ácido ascórbico que se encontra fora da membrana (Ferreira, 2003).

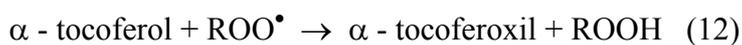


3.3.3. Vitamina E

A vitamina E foi descoberta nos anos 20 como um fator lipossolúvel e chamada de tocoferol. Sua função está relacionada a vários outros nutrientes e fatores endógenos que, coletivamente, compreendem um sistema que protege contra os efeitos potencialmente prejudiciais das espécies reativas de oxigênio, que são formadas metabolicamente ou encontradas no ambiente (Jr, 2002).

Ela é o antioxidante lipossolúvel mais importante na célula. Está localizada nas membranas biológicas, onde protege os fosfolípidios insaturados da membrana da degeneração oxidativa. A vitamina E desempenha esta função através de sua capacidade de reduzir tais radicais a metabólitos não prejudiciais – um processo chamado de “varredura” de radicais livres (Jr, 2002).

A forma mais eficiente, como antioxidante, presente nas membranas biológicas, é a d- α -tocoferol, muitas vezes chamada de RRR-tocoferol. Os tocoferóis inibem a peroxidação lipídica porque seqüestram radicais peroxila (ROO^\bullet) muito mais rapidamente do que este radical pode reagir com os ácidos graxos, ou com proteínas de membrana (reação 12) (Ferreira, 2003).



Então, o α -tocoferol intercepta os radicais peroxila (ROO^\bullet) doa um átomo de hidrogênio, viabilizando a formação de hidroperóxido lipídico (ROOH) transformando-se em radical α -tocoferoxil. Se esse radical α -tocoferoxil reagir novamente com os radicais peroxila (ROO^\bullet) forma-se α -tocoferil quinona (figura 02). O radical α -tocoferoxil resultante é relativamente estável e, em circunstâncias normais, insuficientemente reativo para iniciar a peroxidação lipídica per si, um critério essencial para um bom antioxidante. Vários agentes redutores, incluindo, GSH, ácido ascórbico e ubiquinona, podem reagir com o radical α -tocoferoxil e regenerar o α -tocoferol (Jr, 2002).

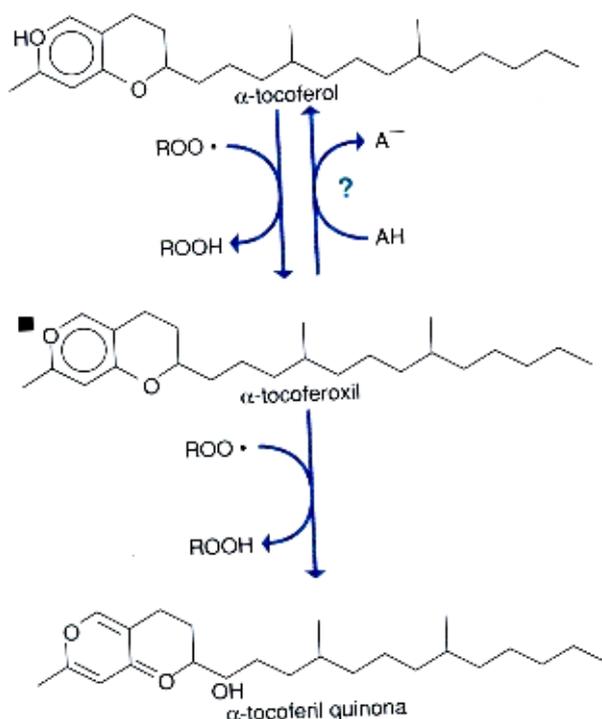


Figura 02: Mecanismo de varredura de radicais livres centralizados no oxigênio (ROO^\bullet) pela vitamina E. Fonte: Jr, 2002.

3.3.4. Carotenóides

Os carotenóides são moléculas de cadeia longa, com 40 átomos de carbono e um extenso sistema conjugado de duplas ligações. Dentre os que possuem efetiva ação antioxidante podemos citar o licopeno e o β -caroteno, este último com atividade de pró-vitamina A. Essas substâncias têm a capacidade de captar a energia de moléculas que se encontram em alto estado energético, absorvendo-a e diminuindo, ou até anulando, tal estado de excitação. Essas transições entre os estados de energia estão associadas com alterações na configuração de elétrons na molécula, o que pode influenciar a reatividade dessas substâncias com outras espécies. Os carotenóides também podem atuar como “varredores” de ROO^\bullet e outras EROS, características do estresse oxidativo (Ferreira, 2003).

4. Estresse Oxidativo

A vida em aerobiose se caracteriza pela contínua produção de EROS, que é contrabalanceada pelo consumo de defesas antioxidantes não enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Assim, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes é mantido. Quando esse balanço é quebrado em favor dos agentes oxidantes, diz que a célula ou organismo se encontra sob “estresse oxidativo”, e está sujeita a potenciais danos (Belló-Klein, 2002). Duas razões principais explicam esse fenômeno: 1) diminuição da atividade antioxidante devido à má nutrição e doenças genéticas; e 2) produção excessiva de espécies reativas de oxigênio por ação da poluição, do fumo, drogas, pesticidas, álcool, alto consumo de gorduras insaturadas, colesterol, ferro e até mesmo o exagero em exercício aeróbicos (Santos, 1998).

As células podem suportar um estresse moderado sem maior dano, entretanto, em casos mais severos pode ocorrer desarranjo metabólico, danos em membranas e morte celular. O excesso de radicais participa significativamente em processos inflamatórios, danos em tecidos, degradação de proteínas, artrite, doenças degenerativas, desenvolvimento de tumores cancerígenos e envelhecimento precoce. Algumas evidências de ocorrência de estresse oxidativo são o acúmulo de pigmentos da

idade, presença de produtos da peroxidação lipídica e excreção pela urina de bases de DNA danificado (Santos, 1998; Ferreira, 2003).

4.1. Evidências do estresse oxidativo

Como já mencionado anteriormente, o estresse oxidativo está associado com uma perturbação no balanço entre pró – oxidantes (ROS e espécies reativas de nitrogênio) e antioxidantes, em favor dos pró – oxidantes. Danos oxidativos no DNA, proteínas e lipídios acumulam com a idade e contribui em doenças degenerativas e para o fenômeno do envelhecimento ao causar desequilíbrio na homeostase celular (Fukagawa, 1999).

Evidências de que o estresse oxidativo causa o envelhecimento originaram-se de estudos onde mutantes de *Drosophila melanogaster*, com expressão aumentada dos genes que codificam as enzimas antioxidantes Cu/Zn superóxido dismutase (SOD) e catalase. Essas apresentaram um tempo de vida 34% maior que moscas selvagens. Uma importante observação feita foi de que esse efeito aparece somente quando ocorre um balanço ótimo entre a SOD e a catalase. Em estudos prévios, a expressão aumentada somente do gene da Cu-Zn SOD ou do gene da catalase tem apenas um pequeno incremento no efeito médio da expectativa de vida e não na taxa máxima de expectativa de vida. Em *Caenorhabditis elegans*, o mutante *age – 1* vive duas vezes mais que o tipo selvagem e também tem um aumento nos níveis de catalase e SOD (Fukagawa, 1999). Diferente de *Drosophila* e *C. elegans*, ratos mutantes (Knock-out) nos genes GPX1, SOD1, SOD2, ou SOD3, que codificam as enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase, não apresentam o fenótipo de envelhecimento rápido (Fukagawa, 1999).

5. Alvos moleculares das espécies reativas de oxigênio

As EROS são capazes de interferir em vários processos biológicos onde o dano causado está relacionado ao tipo da espécie reativa e à molécula atacada. Os principais alvos moleculares dessas espécies reativas são: lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares (Ferreira, 2003).

5.1. Danos a Lipídios

Os lipídios são substâncias de origem biológica, solúveis em solventes orgânicos como clorofórmio e metanol (Voet *et al.*, 2003). Em termos químicos, os lipídios são uma mistura de compostos que partilham algumas propriedades baseadas em similaridades estruturais, principalmente uma preponderância de grupamentos apolares (Campbell, 2003).

Se classificados de acordo com sua natureza química, os lipídios poderão pertencer a dois grupos. Um deles consiste de compostos com a cadeia aberta com cabeças polares e longas caudas apolares e inclui os ácidos graxos, os triacilgliceróis, os esfingolipídeos, os fosfoacilgliceróis e os glicolipídeos. O segundo grupo consiste de composto de cadeia cíclica, os esteróides. Um importante representante desse grupo é o colesterol (Campbell, 2003).

Geralmente, o termo peroxidação lipídica é usado para descrever a degradação não - enzimática de lipídios (Sergent *et al.*, 1999). Esse termo também tem sido definido como dano oxidativo de lipídeos polinsaturados. Os ácidos graxos polinsaturados são aqueles que contêm ao menos duas duplas ligações carbono-carbono. Tanto as membranas celulares como as de organelas (por exemplo, mitocôndrias e os peroxissomos), contêm grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados que podem ser oxidados (Llesuy, 2002). Esse mecanismo de oxidação é uma das principais alterações oxidativas nas membranas biológicas e pode ser induzida por diferentes agentes oxidantes (Kowaltowski & Vercesi, 1999).

Os ácidos graxos polinsaturados isolados e aqueles incorporados às gorduras são facilmente atacados por radicais livres e oxidados a peróxidos lipídicos. Ao contrário, os ácidos graxos monoinsaturados ou saturados são mais resistentes ao ataque de radicais livres (Santos, 1998).

O processo de peroxidação lipídica é iniciado por uma radical livre que retira um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado de membrana (reação 13), levando a geração de radicais lipídicos, que depois combinam com o oxigênio molecular (reação 14) (Kowaltowski & Vercesi, 1999; Sergent *et al.* 1999).



A lipoperoxidação é um processo de reação em cadeia que pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (figura 03) (Llesuy, 2002).

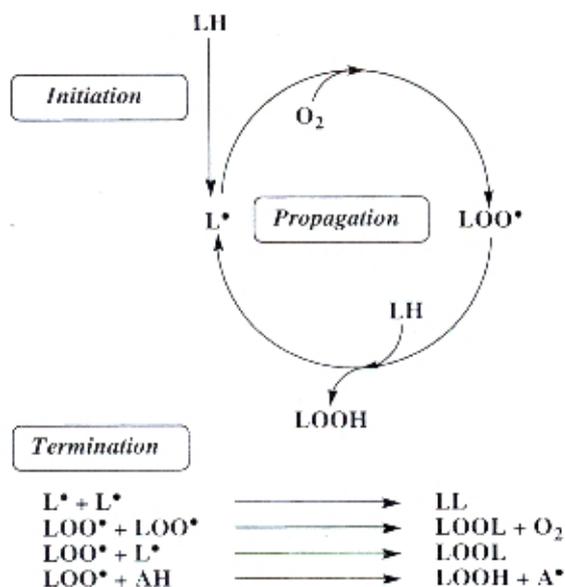


Figura 03: Representação esquemática da peroxidação lipídica. LH, ácido graxo insaturado; LOOH hidroperóxido lipídico; L•, radical alcoxila; LOO•, radical peroxila; AH, antioxidante. Fonte: Sergent *et al.*, 1999.

A iniciação da peroxidação de lipídios é causada pelo ataque de qualquer espécie suficientemente reativa sobre um lipídio, capaz de extrair um átomo de hidrogênio de um grupamento metil. O radical hidroxila é uma das espécies capazes de iniciar a peroxidação lipídica (reação 15). Dessa forma se gera um novo radical (-CH•-) que geralmente se estabiliza através de um rearranjo molecular que forma um dieno conjugado. Em condições aeróbicas, esse radical se combina com O₂ levando a formação de radicais peroxil (ROO•) (reação 16) (Sergent *et al.*, 1999; Llesuy, 2002).



Os radicais peroxil são capazes de extrair um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídio, e assim começa a propagação da peroxidação lipídica (reação 17). Um novo radical centrado em carbono poderá reagir com o oxigênio para formar outro radical peroxil e assim a reação em cadeia da peroxidação lipídica continua, permitindo que o ciclo se repita (Llesuy, 2002).



A etapa de terminação inclui todas as reações em que os radicais se combinam entre si (figura 03). Se o sistema contém antioxidantes, a terminação pode ocorrer pela reação dos radicais lipídicos com antioxidantes fisiológicos como a vitamina E, glutathione, etc (Kowaltowski & Vercesi, 1999; Sargent *et al.*, 1999).

Os efeitos gerais, decorrentes da peroxidação de lipídios são: diminuição da fluidez de membranas, aumento da permeabilidade da bicamada da membrana a substâncias que habitualmente não a atravessam, a não ser através de canais específicos, diminuição no potencial de membrana e, inativação de sistemas enzimáticos ligados à membrana (Sargent *et al.*, 1999; Ferreira, 2003). Porém, está claro que as células possuem um sistema de reparo para lipídeos oxidados (exemplo, a fosfolipase A2 cliva os lipídeos peroxidados em fosfolipídeos) (Beckman & Ames, 1998).

Peroxidação lipídica da membrana mitocondrial resulta em perda irreversível das funções mitocondriais como a respiração mitocondrial, fosforilação oxidativa e transporte de íons (Kowaltowski, 1999).

5.2. Danos a proteínas

As proteínas desempenham uma variedade de funções essenciais em todos os organismos. Essas podem ser agrupadas em dinâmicas e estruturais. As funções dinâmicas incluem transporte, controle metabólico, contração e catálise de transformações químicas. Nas funções estruturais, as proteínas fornecem matriz para ossos e tecido conjuntivo, dando estrutura e forma ao organismo humano (Devlin, 1997).

A exposição de proteínas a ação de EROS ou a produtos de peroxidação lipídica, pode levar a oxidação de resíduos de aminoácidos, à formação de ligações cruzadas entre proteínas e a oxidação do núcleo estrutural, levando à fragmentação da proteína. A oxidação de uma proteína pode desta forma, levar à perda de sua função. Por exemplo, as espécies reativas podem, também, inativar as proteínas de reparo do DNA causando danos em sua atividade (Ferreira, 2003).

5.2.1. Oxidação das cadeias laterais de aminoácidos

Todos os resíduos de aminoácidos das proteínas são susceptíveis a oxidação por OH^\bullet . Entretanto, os produtos formados pela oxidação de alguns resíduos não têm sido bem caracterizados (Berlett & Stadtman, 1997).

A tiolação do enxofre (S) de proteínas tem um papel protetor pela prevenção da oxidação irreversível de resíduos de cisteína. Proteínas contendo resíduos de cisteína oxidados são reativadas por detiolação, provavelmente redução via glutatona, glutaredoxinas, tioredoxinas ou proteínas disulfito isomerase. Proteínas irreversivelmente inativadas pela formação de derivados de metionina sulfóxido ou carbonil não podem ser reparadas. Portanto, essas proteínas são alvo de vias proteolíticas (figura 04) (Ferreira 2002).

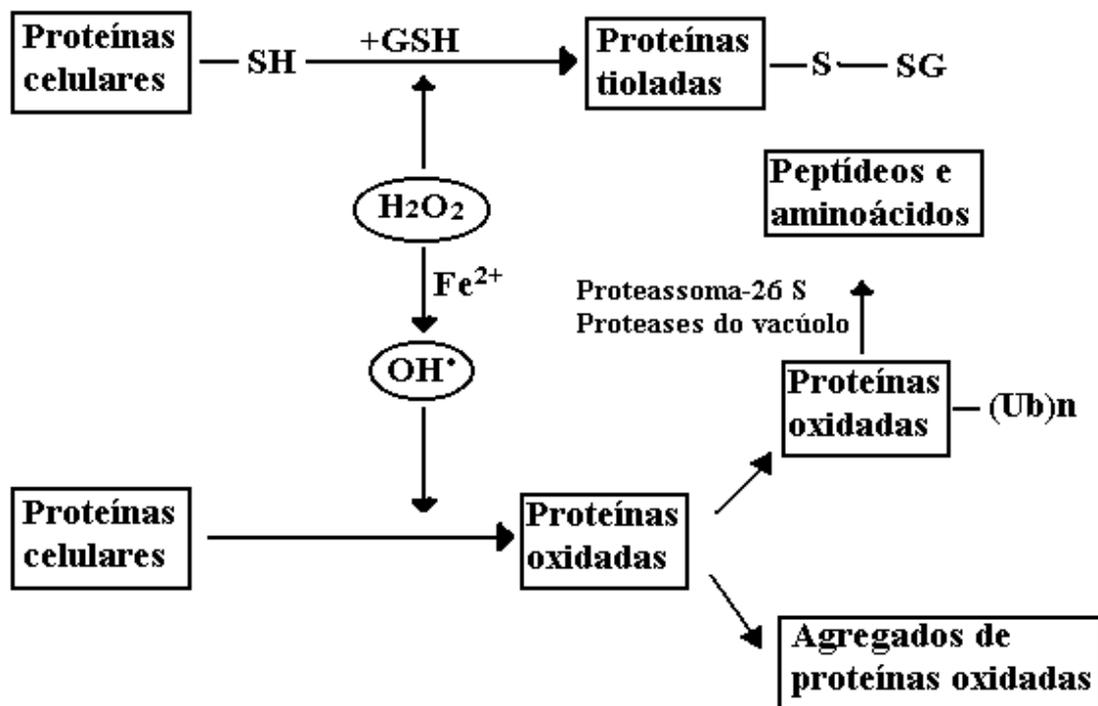


Figura 04: S – Tiolação de proteínas e proteólise de proteínas oxidadas. Os grupos tíóis nas proteínas são protegidos da oxidação induzida por peróxido de hidrogênio pela S – tiolação com glutatona. Radicais hidroxilas, gerados pela reação de Fenton, danificam irreversivelmente proteínas. Essas proteínas são ubiquitinadas e degradadas em peptídeos e aminoácidos pela proteassoma – 26 S e proteases do vacúolo. Proteínas extensivamente oxidadas formam agregados que não podem ser degradados pelos sistemas proteolíticos (Fonte: Ferreira, 2002).

catalizada por um metal (reações a e b). O radical carbono centralizado depois de formado reage rapidamente com o O_2 para formar um radical peroxila intermediário (reação d), que originará um radical hidroperóxido (reação f) seguindo para a formação de um radical alcóxila (reação h) que pode ser convertido a uma proteína hidroxila derivada (reação j). Significativamente, muitos passos nessas reações que são mediados pelas interações com HO_2^\bullet podem ser catalizados pelo Fe^{2+} (reações e, g, e i) ou pelo Cu^+ (não mostrado). Os radicais intermediários formados durante esse percurso podem sofrer reações com outros aminoácidos na mesma proteína ou com proteínas diferentes gerando um novo radical carbono centralizado. Além disso, na ausência de oxigênio, quando a reação d na figura 10 é prevenida, o radical carbono centralizado pode reagir com outro radical carbono centralizado para formar uma ligação cruzada proteína – proteína (Berlett & Stadtman, 1997).

5.2.3. Fragmentação protéica

A geração de radicais alcóxila proporciona condições para a clivagem da ligação peptídica através da formação da diamida ou da α amidação (figura 06). No caminho que leva a produção da diamida, o fragmento peptídico derivado da porção N – terminal da proteína possui uma estrutura diamida no final do carbono terminal, enquanto o peptídeo derivado da porção C-terminal da proteína possui uma estrutura isocianato no final do nitrogênio terminal. Em contraste, através da α amidação, a fragmentação peptídica derivada da porção N – terminal da proteína possui um grupamento amida no final do carbono terminal, enquanto o resíduo do aminoácido do N – terminal do fragmento derivado da porção C – terminal da proteína existe como um derivado N - α - cetoacil. Através da hidrólise ácida, os fragmentos peptídicos obtidos pelo caminho da diamida liberam CO_2 , NH_3 e um ácido carboxílico livre, enquanto a hidrólise de um fragmento obtido pelo caminho da α amidação libera NH_3 e um ácido α cetocarboxílico livre. A clivagem de cadeias polipeptídicas pode ocorrer também como resultado do ataque de EROS a cadeias laterais contendo prolina, glutamina e aspartina (Berlett & Stadtman, 1997).

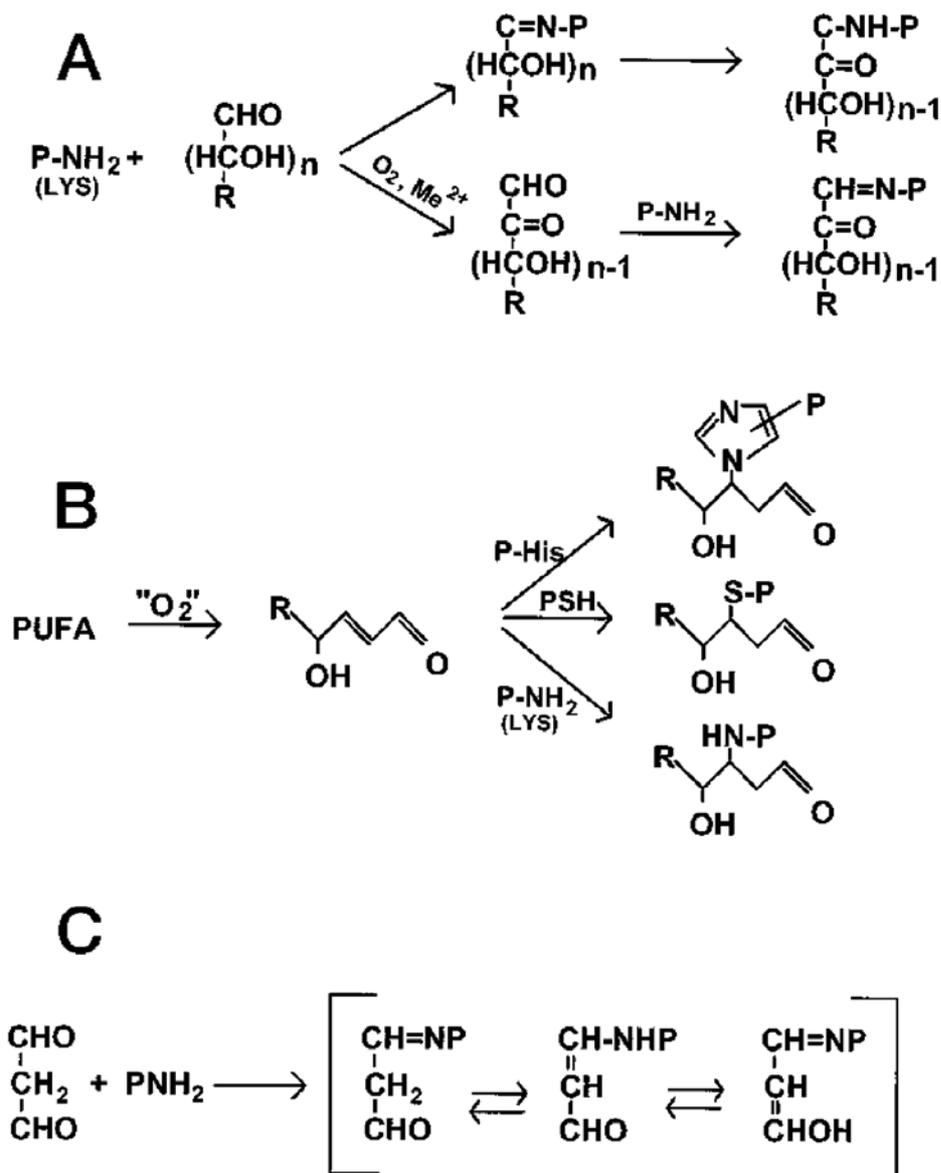


Figura 07: Formação de carbonils através da glicação, glicoxidação, e pela reação com produtos da peroxidação lipídica. A, reação de açúcares com proteínas contendo grupamento lisina (P-NH₂). B, adição de Michael de 4-hidroxil-2-nonenal a proteína contendo lisina (P-NH₂), histidina (P-His), ou cisteína (PSH) como resíduo. C, reação de grupamentos aminos de proteínas (PNH₂) com produtos da peroxidação lipídica. Fonte: Berlett & Stadtman, 1997.

5.2.5. Acúmulo de proteínas oxidadas

Os níveis intracelulares de oxidação de proteínas refletem o balanço entre a taxa de oxidação protéica e a taxa de proteínas oxidadas degradadas. Esse balanço é uma

função complexa de numerosos fatores que levam a formação de EROS de um lado, e de múltiplos fatores que determinam as concentrações e/ou atividades de proteases que degradam proteínas com danos oxidativos do outro. A figura 08 ilustra muitos processos fisiológicos e ambientais diferentes que levam à formação de EROS. Coletivamente, esses processos podem promover a geração de uma variedade de EROS incluindo um número de radicais livres (OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, R^\bullet , ROO^\bullet , RO^\bullet , NO^\bullet , RS^\bullet , ROS^\bullet , RSOO^\bullet e $\text{RSSR}^{\bullet-}$), vários não radicais derivados de oxigênio (H_2O_2 , ROOH , $^1\text{O}_2$, O_3 , HOCl , ONOO^- , $\text{O}=\text{NOCO}_2$, $\text{O}_2\text{NOCO}_2^-$, N_2O_2 , NO_2^+), e espécies altamente reativas de lipídios ou de carboidratos derivados de compostos de carbonos. Alguns desses EROS são capazes de promover a modificação de proteínas. Entretanto a habilidade das EROS de causar danos oxidativos depende da concentração de antioxidantes enzimáticos e não – enzimáticos, que são capazes de inibir a formação de EROS ou facilitar a sua conversão em derivados inativos (Stadman, 1992; Berlett & Stadman, 1997). Como descrito anteriormente, o acúmulo de proteínas oxidadas reflete, não somente a taxa de proteínas oxidadas, mas também a taxa de proteínas oxidadas degradadas, que também é dependente de muitas variáveis, incluindo a concentração de proteases, que preferencialmente degradam proteínas e numerosos fatores (íons metálicos, inibidores, ativadores e reguladores de proteínas) que afetam suas atividades proteolíticas (Berlett & Stadman, 1997).

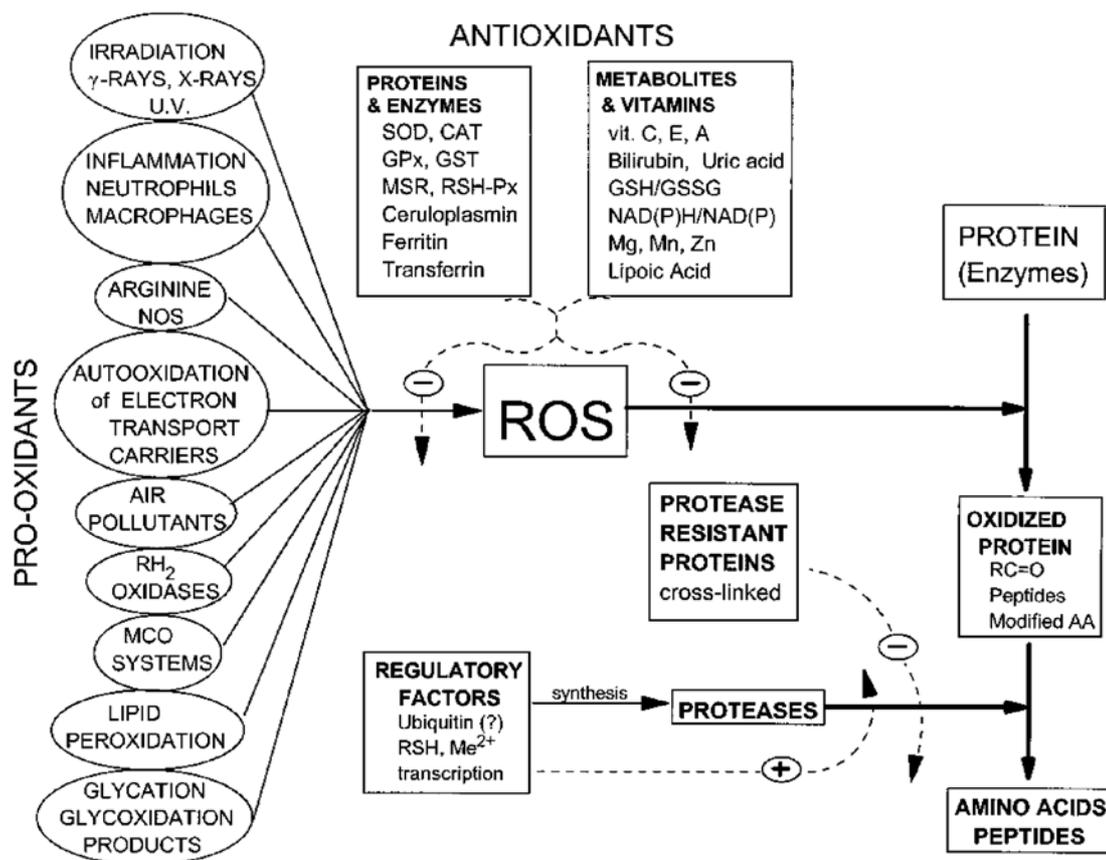


Figura 08: O acúmulo de proteínas oxidadas é dependente do balanço entre pró – oxidantes, antioxidantes e atividades proteolíticas. Fonte: Berlett & Stadtman, 1997.

5.3. Dano ao DNA

O DNA é um polímero de desoxirribonucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster que formam uma fita dupla (Voet *et al.*, 2002). Todos os organismos sofrem um certo número de danos a esse material genético como resultado de operações celulares normais ou de interações aleatórias com o ambiente. As reações endógenas que contribuem para o dano no DNA são, oxidação, metilação, depurinação e deaminação (Wiseman & Halliwell, 1996). Os danos oxidativos aos ácidos nucleicos incluem mudanças de base ou do grupamento açúcar, quebra da fita simples ou dupla e ligações cruzadas com outras moléculas (Croteau & Bohr, 1997).

As principais conseqüências do dano oxidativo às bases são o aparecimento de mutações, diretamente pela ação de EROS / ERN, ou durante as tentativas das células de reuplicar ou reparar o DNA danificado (Ferreira, 2003).

Algumas das modificações de base estão mostradas na figura 09. Porém uma das mais abundantes modificações induzidas no DNA pelas EROS é a oxidação da guanina produzindo 7,8 – dihidro – 8 – oxoguanina (8 – oxoG) chamada também de 8 – hidroxiguanina. Esta base alterada pode parear com adeninas (A) como também com resíduos de citosinas (C), levando a uma frequência altamente crescente de mutações G : C → T : A (Audabert *et al.*, 2002).

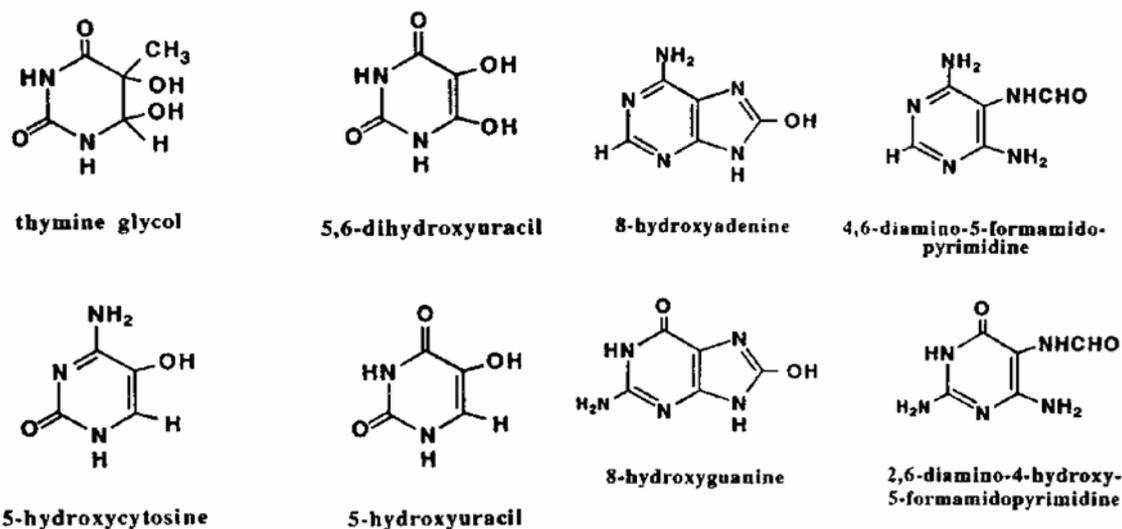


Figura 09: Exemplos de modificações de bases em DNA de mamíferos causadas por oxidações. Fonte Croteau & Bohr, 1997.

O dano oxidativo ao DNA contribui para a carcinogênese, envelhecimento e degenerações neurológicas. Estudos mostram que os danos oxidativos ao DNA acumulam em tecidos cancerígenos. Por exemplo, altos níveis de danos oxidativos de bases são observados em câncer de pulmão quando comparado com tecidos normais. Um outro estudo relata um aumento em 8-oxoG e 2,6-diamina-4-hidroxi-5-formamidopirimidina em DNA proveniente de tecido mamário com câncer, quando comparado com tecidos normais. No mal de Alzheimer alguns estudos têm mostrado um acúmulo de dano oxidativo no cérebro e um recente estudo com células de familiares de pessoas que possuem essa doença demonstrou uma deficiência no processamento do dano ao DNA quando esse era induzido por luz fluorescente (Croteau & Bohr, 1997).

O DNA é um alvo biologicamente muito importante para EROS, porém o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) formado pela oxidação monovalente do oxigênio, assim como H_2O_2 , praticamente não reagem com o DNA. Na verdade, o H_2O_2 exerce seus efeitos

citotóxicos através de sua participação na reação de Fenton. Assim, o dano ao DNA, dependente de H_2O_2 , parece não ser devido aos radicais hidroxila que difundem até o sítio de ataque, mas sim a oxidantes de Fenton produzidos sobre íons Fe associados com o DNA (Beckman & Ames, 1997).

O DNA possui em sua cadeia grupos fosfatados carregados negativamente e são efetivamente um grande ânion capaz de se ligar a muitos cátions presentes no núcleo, tais como ferro e cobre. Isto não quer dizer que esses metais estão constantemente interagindo na formação de OH^\bullet . Uma possibilidade é que o estresse oxidativo causa a liberação de íons ferro e/ou cobre intracelular que, então, ligam-se ao DNA, tornando-o um alvo ao ataque de H_2O_2 (Ferreira, 2003).

O DNA mitocondrial (mtDNA) está ligado a membrana mitocondrial interna e é particularmente propenso ao dano oxidativo devido essa proximidade (Kowaltowski & Vercesi, 1999; Mandavilli *et al.*, 2002).

Devido ao fato do mtDNA codificar proteínas essenciais envolvidas no processo da fosforilação oxidativa, danos a esse material genético leva a uma disfunção da CTE, estimulando conseqüentemente uma maior geração de EROS e danos oxidativos ao mtDNA (Kowaltowski & Vercesi, 1999).

Como a produção de EROS aumenta ao longo da vida, esses dados sugerem que o funcionamento mitocondrial pode diminuir com a idade (Wallace, 1999). Além disso, o acúmulo de mutações no mtDNA tem sido associado com algumas formas de câncer e doenças neurodegenerativas (Audabert *et al.*, 2002).

Alguns estudos usando HPLC, detecção eletroquímica da de base modificada 8 – hidroxiguanina (8 – oxoG), sugeriram que o mtDNA é de fato mais susceptível ao dano do que o nDNA (Audabert *et al.*, 2002; Mandavilli *et al.*, 2002). Essa maior susceptibilidade do DNA mitocondrial ao dano oxidativo pode ser devido a alguns fatores, incluindo: (01) a ausência de uma organização complexa da cromatina (ausência de histonas), que pode servir como barreira contra o ataque de EROS; (02) alterações na atividade das enzimas de reparo do DNA; (03) a presença localizada de íons metálicos que podem funcionar como catalisadores na formação de EROS; (04) a estimulação de reações de EROS secundárias devido ao dano à CTE e / ou através da peroxidação lipídica (Ferreira, 2002) e (05) a ausência de introns (Audabert *et al.*, 2002).

5.4. Sistema de reparo do DNA

Devido ao fato de enzimas antioxidantes, as quais constituem o primeiro nível de defesa contra o ataque de EROS a componentes celulares, nem sempre serem capazes de evitar totalmente o dano por essas espécies reativas, o processo evolutivo também garantiu a manutenção e desenvolvimento de sistemas de reparo de componentes celulares danificados, que constituem a segunda linha de defesa contra oxidantes (Stryer, 1996).

Sistemas de reparo do DNA estão envolvidos na remoção de pelo menos algumas lesões no DNA, que podem resultar do ataque do radical hidroxila e de outras espécies reativas de oxigênio. Quebras na fita simples são usualmente reparadas rapidamente. De fato, elas são geradas como intermediárias no reparo de outras lesões. Oito – hidroxiguanina, por exemplo, é vagarosamente removida do DNA. A parte da fita de DNA danificada é removida seguida pela síntese do DNA e junção da fita por uma enzima DNA ligase (Ferreira, 2002).

Existem múltiplas vias para reparar as várias formas de dano ao DNA, dentre outras: reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo acoplado à transcrição (TCR) e reparo por pareamento incorreto (MMR) (Ferreira, 2002).

O BER é um mecanismo de reparo multi-enzimático baseado na retirada de algumas bases da fita danificada em um trecho que envolva o erro, com subsequente preenchimento e ligação da fita corrigida. Este é o tipo de reparo no caso de haver um único nucleotídeo com dano, utilizado para danos nas bases produzidos por radiação ionizante e por agentes metilantes e oxidantes (Gonzalez *et al.*, 2003).

O NER é um mecanismo que envolve pelo menos 30 proteínas capazes de corrigir lesões causadas por UV, adutos químicos e algumas formas de dano oxidativo, funcionam de um modo semelhante a “cortar e colar” (Hanawalt, 1994; citado em Ferreira, 2002). Então esse mecanismo também envolve a retirada de um fragmento de DNA em torno da lesão. Este processo atua mais comumente em danos que causam distorções volumosas na hélice de DNA. A excisão elimina oligômeros que têm de 25 a 32 nucleotídeos de comprimento (Gonzalez *et al.*, 2003).

6. Mitocôndria e seu papel no estresse oxidativo.

6.1. Morfologia da mitocôndria.

A mitocôndria (do grego, *mitos*, linha + *chondros*, grânulo) é o sítio do metabolismo oxidativo dos eucariotos (figura 10). Ela varia de tamanho e de forma, dependendo de sua origem e de seu estado metabólico, mas são freqüentemente elipsoidais com dimensões de aproximadamente $0,5 \times 1,0 \mu\text{m}$ – o tamanho de uma bactéria (Voet *et al.*, 2002). Uma célula pode conter desde uma centena, até muitos milhares de mitocôndrias. As células fisiologicamente ativas, como as encontradas nos músculos, no fígado e nos rins, têm um grande número de mitocôndrias, porque usam ATP em grande quantidade. As mitocôndrias ficam em geral situadas em locais na célula onde a necessidade de energia é maior, como entre proteínas contráteis nas células musculares (Tortora & Grabowski, 2002).

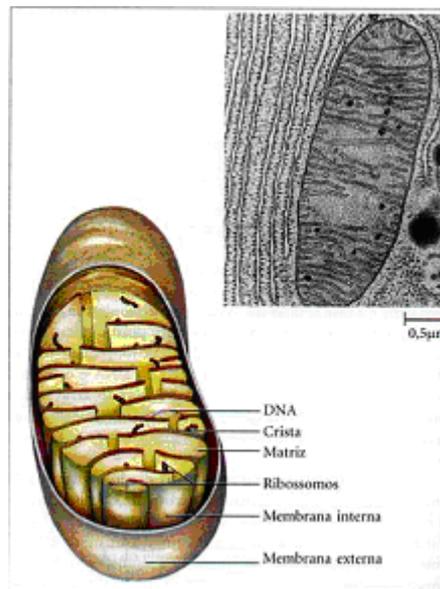


Figura 10: À esquerda, desenho esquemático de uma mitocôndria, mostrando sua morfologia e alguns dos seus componentes. À direita, microscopia eletrônica mostrando também a morfologia mitocondrial. Fonte: Nelson & Cox, 2002.

Diferentemente de outras estruturas membranosas, como os lisossomos e os complexos de Golgi, as mitocôndrias se auto-replicam, um processo que ocorre durante os períodos de demanda de maior energia celular, ou antes da divisão celular. Cada

mitocôndria contém seu próprio DNA, RNA e ribossomos. Ela possui múltiplas cópias de uma molécula circular de DNA, contendo, cada uma, 37 genes. O mtDNA humano tem 16,5 kb de comprimento e codifica 13 polipeptídeos envolvidos na fosforilação oxidativa, 2 rRNAs e 22 tRNAs (figura 11). Os genes mitocondriais junto com os genes nucleares controlam a produção de proteínas que as mitocôndrias. Visto que os ribossomos também estão presentes na matriz mitocondrial, parte da síntese de proteínas ocorre nas mitocôndrias (Mandavilli *et al.*, 2002; Nelson & Cox, 2002; Tortora & Grabowski, 2002).

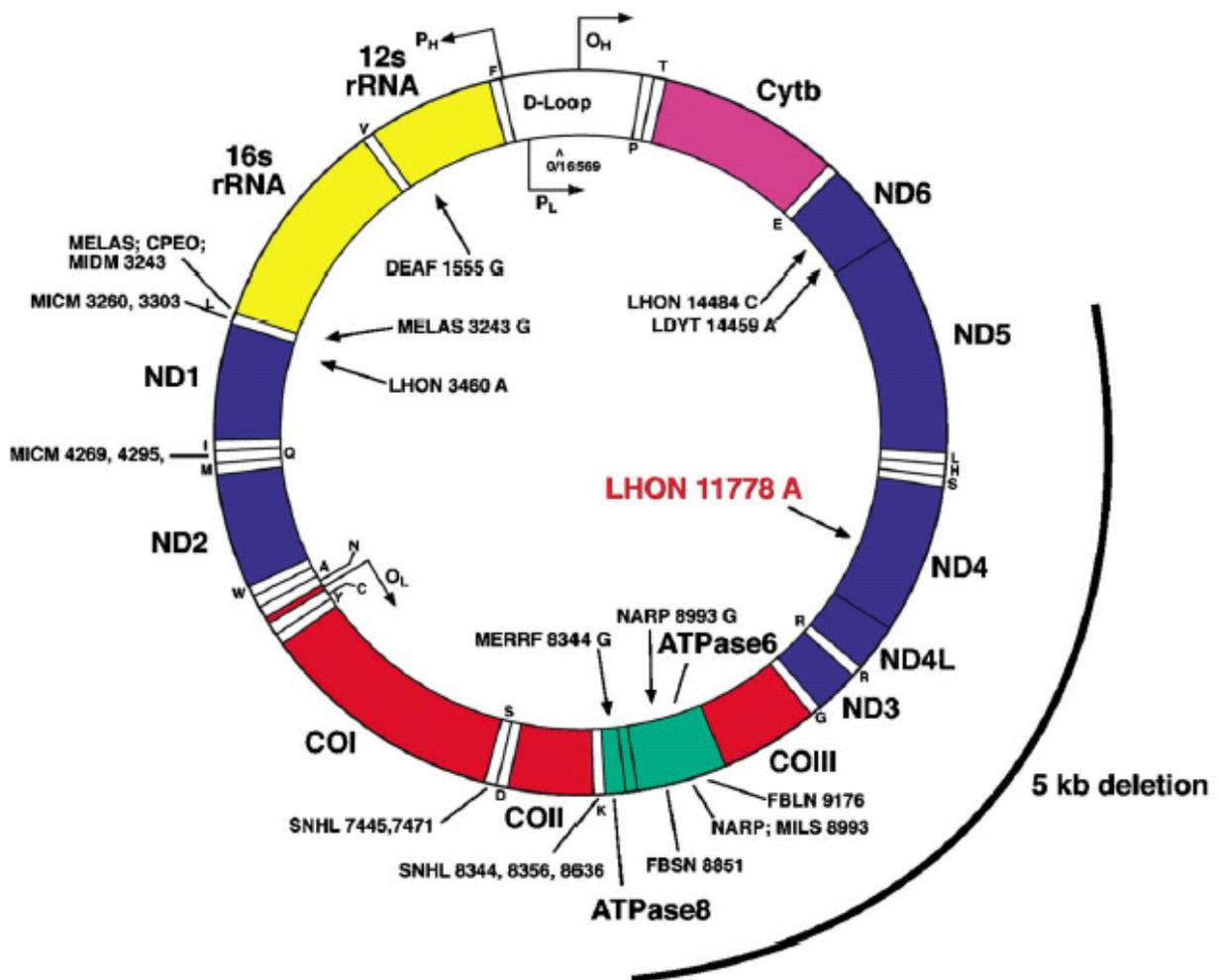


Figura 11: Genoma mitocondrial humano. O genoma mitocondrial humano possui 22 genes de tRNA (branco), dois genes de rRNA (amarelo) e genes que codificam 13 polipeptídeos para o complexo I (azul), o complexo II (rosa), complexo IV (vermelho) e ATP sintase (verde). A posição de vários pontos de mutação e a deleção de 5kb estão indicados. Fonte: Mandavilli *et al.*, 2002.

A mitocôndria está envolvida por uma membrana externa lisa e contém uma extensiva invaginação na membrana interna. O número de invaginações, chamadas de cristas, reflete a atividade respiratória da célula. A membrana interna divide a mitocôndria em dois compartimentos: o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial (Voet *et al.*, 2002).

A membrana mitocondrial externa é livremente permeável a pequenas moléculas e íons. Da mesma forma que a membrana plasmática, essa membrana mitocondrial contém porinas, proteínas que permitem a difusão de moléculas de até 10kD. Portanto, o espaço intermembrana é equivalente ao citosol no que se refere às suas concentrações em metabólitos e íons. A membrana interna, composta aproximadamente de 75% de proteínas, é consideravelmente mais rica em proteínas que a membrana externa. Ela é livremente permeável somente a O₂, CO₂ e a H₂O, e é impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluindo o H⁺. Ela contém, além das proteínas da cadeia respiratória, várias proteínas de transporte que controlam a passagem de metabólitos, como o ATP, o ADP, o piruvato, o Ca²⁺ e o fosfato. A impermeabilidade controlada da membrana mitocondrial interna para a maioria dos íons e dos metabólitos permite a formação de um gradiente de íons através dessa barreira e resulta na compartimentalização das funções metabólicas entre o citosol e a mitocôndria (Nelson & Cox, 2002; Voet *et al.*, 2002).

A matriz mitocondrial, cercada pela membrana interna, contém o complexo da piruvato desidrogenase, as enzimas do ciclo do ácido cítrico, as enzimas da β-oxidação dos ácidos graxos, as enzimas da oxidação dos aminoácidos, além de DNA, ribossomos, muitas outras enzimas, ATP, ADP, Pi, Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺ e muitos intermediários metabólicos solúveis. Em resumo, ela contém todas as vias da oxidação dos combustíveis, exceto a glicólise, que ocorre no citosol (Nelson & Cox, 2002).

6.2. Cadeia Transportadora de elétrons (CTE)

A energia derivada da oxidação dos combustíveis metabólicos é convertida em ATP, que é a energia de rápida mobilização na célula. Em células eucarióticas, sob condições aeróbicas, o ATP é gerado como resultado do transporte de elétrons ao longo da membrana interna da mitocôndria, acoplado com o transporte de prótons através da membrana interna. A cadeia transportadora de elétrons é constituída por quatro complexos enzimáticos intimamente relacionados, que estão inseridos na membrana

mitocondrial interna (Campbell, 2003). Segundo Mandavilli *et al* (2002), a CTE tem cinco complexos: a NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), complexo do citocromo bc₁ (complexo III), citocromo c oxidase (complexo IV) e ATP sintase (complexo V) (figura 12).

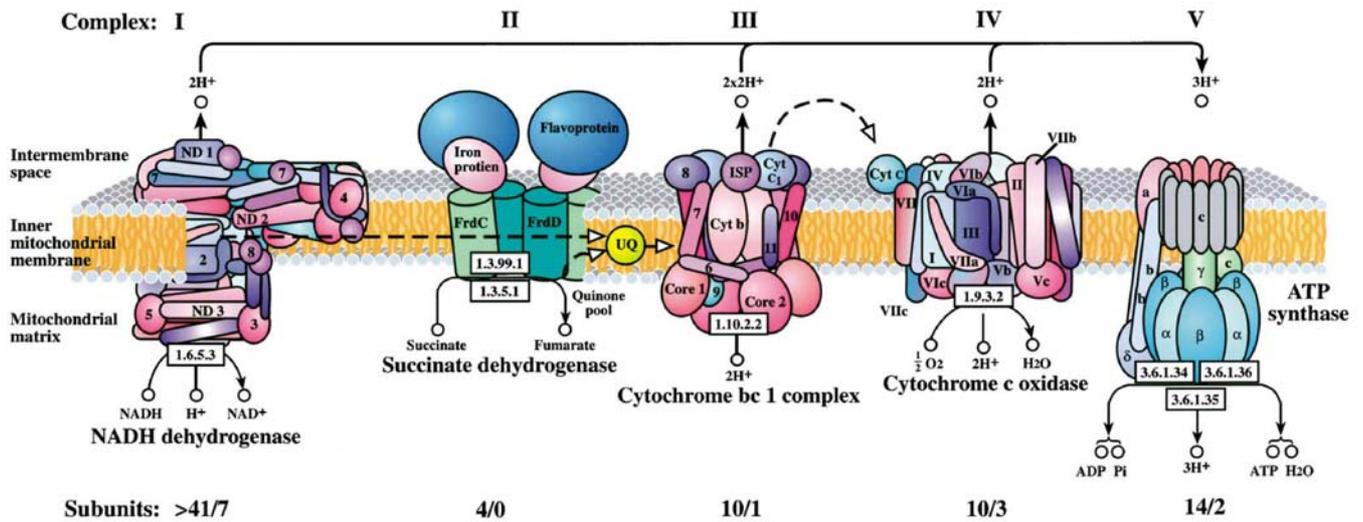


Figura 12: Cadeia transportadora de elétrons. Representação esquemática do complexo transportador de elétrons em mamíferos. Os elétrons passam do NADH ou succinato para o complexo I e II respectivamente, e subseqüentemente para a ubiquinona. Os elétrons depois fluem da ubiquinona através dos complexos III e IV até o receptor final (oxigênio). A passagem de elétrons por esses complexos é acoplada ao movimento de prótons para o espaço intermembrana, resultando em um gradiente de prótons. O complexo ATP sintase utilizada a energia gerada por esse gradiente para gerar ATP. Fonte: Mandavilli *et al.*, 2001.

Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores diferentes: O NADH (complexo I) e o succinato (complexo II). O complexo III transporta elétrons da ubiquinona até o citocromo c, e o complexo IV completa a seqüência transferindo elétrons do citocromo c para o O₂ (Nelson & Cox, 2002). A seqüência desses carreadores de elétrons, de um modo geral, reflete seus potenciais de redução, e o processo global de transporte de elétrons é exergônico. Assim os elétrons são passados ao longo dessa cadeia do menor ao maior potencial de redução padrão (Voet *et al.*, 2002).

O complexo I (NADH – coenzima Q oxidoreductase ou, NADH: ubiquinona oxidoreductase), que transfere elétrons a partir do NADH para a coenzima Q (CoQ), é o maior complexo protéico da membrana mitocondrial interna. Tem a forma de L, com

um braço do L na membrana e o outro se prolongando em direção à matriz. Essa grande enzima é composta por 42 cadeias polipeptídicas diferentes, incluindo uma molécula de mononucleotídeo de flavina (FMN, um grupo prostético com atividade redox que difere do FAD somente pela ausência do grupo AMP) e pelo menos seis centros de Fe-S que participam no transporte de elétrons. O complexo I catalisa simultânea e obrigatoriamente dois processos acoplados: (1) a transferência exergônica de um íon hidreto do NADH para a ubiquinona e um próton da matriz e (2) a transferência endergônica de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranoso (Nelson & Cox, 2002; Voet *et al.*, 2002).

A coenzima Q, também chamada de ubiquinona, não é nem um nucleotídeo nem uma proteína, mas um transportador de elétrons lipofílico. Como as coenzimas de nicotinamida e, numa certa extensão, o citocromo c, a coenzima Q serve como um componente transportador “móvel”, que opera entre as várias desidrogenases ligadas a flavina (NADH desidrogenase, succinato desidrogenase e acil graxo CoA desidrogenase) e o citocromo b na cadeia de transporte de elétrons (Delvin, 1998).

O ubiquinol (QH₂, forma completamente reduzida da ubiquinona) difunde-se na membrana interna, do complexo I até o complexo III, onde é oxidado a Q em um processo que envolve movimento de prótons para o espaço intermembranas (Nelson & Cox, 2002).

O complexo II recebe o nome de succinato desidrogenase ou succinato – coenzima Q oxidorreductase, possui a única enzima do ciclo de Krebs que é ligada à membrana mitocondrial interna (succinato desidrogenase). Assim como o primeiro complexo da CTE esse complexo transfere elétrons para a CoQ. Embora menor e mais simples que o complexo I, este complexo contém dois tipos de grupos prostéticos e, pelo menos, quatro proteínas diferentes. Uma proteína possui um FAD ligado covalentemente e um centro Fe-S com quatro átomos de Fe; uma segunda proteína ferro-enxofre também está presente. Os elétrons passam do succinato para o FAD e, então, através dos centros Fe-S, para a ubiquinona (Campbell, 2003; Nelson & Cox, 2002; Voet *et al.*, 2002).

O terceiro complexo, chamado de complexos dos citocromos bc₁, ou ubiquinona-citocromo c oxidorreductase, catalisa a oxidação da coenzima Q reduzida (CoQH₂). Esse complexo acopla a transferência de elétrons do ubiquinol (QH₂) para o citocromo c com o transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembranoso (Campbell, 2003; Nelson & Cox, 2002). Esse complexo contém dois

citocromos tipo b, um citocromo c_1 e um centro [2Fe-2S] (conhecido como centro Rieske). Sua função é permitir que uma molécula de CoQH_2 , um transportador dieletrônico, reduza duas moléculas de citocromo c, um transportador monoeletrônico. Isso ocorre por meio de uma bifurcação inesperada do fluxo de elétrons da CoQH_2 para o citocromo c_1 e para o citocromo b (no qual o segundo fluxo também é cíclico). Esse é o chamado ciclo Q, que permite que o complexo III bombeie prótons da matriz para o espaço intermembrana. A essência do ciclo Q é que a CoQH_2 sofre uma reoxidação em dois ciclos nos quais a semiquinona, $\text{CoQ}^{\bullet-}$, é um intermediário estável (Voet *et al.*, 2002).

Os elétrons que fluem do citocromo c_1 são transferidos para o citocromo c, o qual difere dos outros citocromos da CTE por ser uma proteína localizada na periferia membrana, ou seja, é uma proteína solúvel do espaço intermembranoso. Após o seu único heme aceitar um elétron do complexo III, o citocromo c se move pela superfície externa da membrana mitocondrial externa em direção ao complexo IV para doar o elétron para um centro de cobre binuclear nessa enzima (Nelson & Cox, 2002; Voet *et al.*, 2002).

O quarto complexo, a citocromo c oxidase, é uma proteína grande da membrana mitocondrial interna e catalisa a etapa final do transporte de elétrons, ou seja, a transferência de elétrons do citocromo c ao oxigênio. Além disso, ocorre um bombeamento de prótons como resultado da reação (Campbell, 2003). O complexo IV contém quatro centros redox: citocromo a, citocromo a_3 , um átomo de cobre conhecido como centro Cu_B e um par de átomos de cobre conhecido como centro Cu_A . Além disso, há um íon Mg^{2+} e um íon Zn^{2+} (Voet *et al.*, 2002). A transferência de elétrons por meio do complexo IV ocorre do citocromo c para o centro Cu_A , do heme a para o heme a_3 para o centro Cu_B e, finalmente para o O_2 . Para quatro elétrons que passam através desse complexo, a enzima consome quatro H^+ da matriz, convertendo o O_2 em $2\text{H}_2\text{O}$. Esta redução de quatro elétrons do O_2 envolve centros redox que transportam apenas um elétron de cada vez e ela deve ocorrer sem gerar intermediários incompletamente reduzidos, tais como o peróxido de hidrogênio ou os radicais hidroxilas livres, que são espécies muito reativas que podem danificar os componentes celulares. Os intermediários permanecem firmemente ligados ao complexo até serem completamente convertidos em água (Nelson & Cox, 2002).

6.3. Geração de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria

A CTE consome mais de 90% do oxigênio obtido pela célula, dessa porcentagem, por volta de 1-5% é convertido em superóxido ($O_2^{\bullet-}$) até mesmo durante o estado fisiológico normal. Essa taxa basal de produção de $O_2^{\bullet-}$ pode ser alterada em condições patológicas, resultando em elevado estresse oxidativo (Mandavilli *et al.*, 2002).

As estimativas sugerem que o maior sítio de produção de EROS são as mitocôndrias. Nas mitocôndrias em estado fisiológico normal, o oxigênio é reduzido a H_2O pela citocromo c oxidase. A liberação de intermediários de oxigênio incompletamente reduzidos não ocorre durante esse processo devido à alta afinidade da citocromo c oxidase por essas moléculas. Assim a produção de $O_2^{\bullet-}$ através da redução monoelétrica do O_2 é praticamente inexistente a nível da citocromo c oxidase (Kowaltowski & Vercesi, 1999).

A produção de radicais superóxido na mitocôndria ocorre em dois pontos da CTE: no complexo I (NADH – coenzima Q oxidoreductase) e ao nível da coenzima Q. Sob condições metabólicas normais, a coenzima Q é o principal sítio de produção de EROS (Finkel & Holbrook, 2000).

Como já mencionado, o complexo I é uma grande enzima composta por 42 cadeias polipeptídicas diferentes, incluindo uma molécula de mononucleotídeo de flavina (FMN). O FMN e a CoQ podem, cada um, adotar três estados de oxidação (figura 13). Eles são capazes de aceitar e de doar um ou dois elétrons porque suas formas semiquinonas são estáveis. As semiquinonas são radicais livres estáveis moléculas com um elétron não pareado (Voet *et al.*, 2002). São esses radicais que podem doar elétrons ao O_2 , formando o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

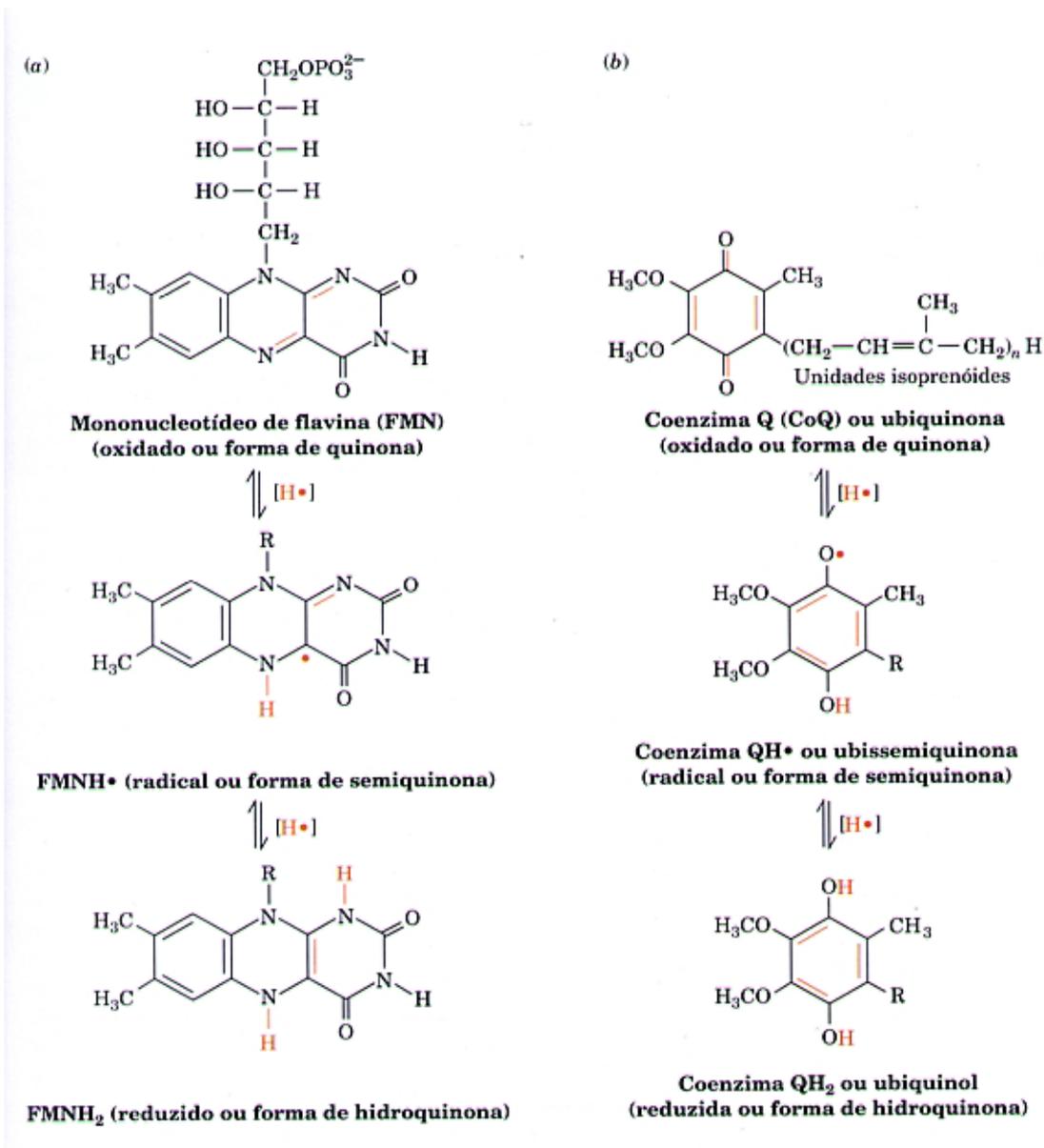


Figura 13: Estados de oxidação do FMN e da coenzima Q. Tanto o FMN (a) como a coenzima Q (b) possuem estados de semiquinonas como radicais livres. Fonte: Voet *et al.*, 2002.

Na CTE de mamíferos funcionando normalmente, os elétrons são transferidos da NADH – coenzima Q oxidorredutase para a coenzima Q (UQ) oxidada, produzindo a forma reduzida da coenzima Q (UQH₂). A UQH₂ quando transfere elétrons para o complexo citocromo bc1 é convertida novamente em UQ, passando primeiramente pela forma intermediária semiquinona (UQ^{•-}). Esse processo ocorre inicialmente na face citoplasmática da membrana mitocondrial interna, e depois é repetido na face da membrana voltada para a matriz (Kowaltowski & Vercesi, 1999; Finkel & Holbrook, 2000).

Determinações da formação de EROS pelas mitocôndrias usando diferentes inibidores da CTE tem demonstrado que a antimicina A (bloqueia a transferência de elétrons do citocromo b para o citocromo c) estimula a formação de $O_2^{\bullet-}$, enquanto mixotiazol (impede a transferência de elétrons do centro Fe-S para a ubiquinona) inibindo a formação desse radical na ubiquinona (Kowaltowski & Vercesi, 1998; Nelson & Cox, 2002). A antimicina A estimula a formação de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial a nível da NADH – coenzima Q oxidoredutase e da coenzima Q, enquanto mixotiazol estimula somente a formação de $O_2^{\bullet-}$ ao nível da NADH – coenzima Q oxidoredutase. Por isso é lógico supor que a geração de $O_2^{\bullet-}$ pela CTE pode ocorrer preferencialmente ao nível coenzima Q, através do acúmulo de $UQ^{\bullet-}$ e a doação de um elétron da $UQ^{\bullet-}$ para o O_2 . Essa suposição é confirmada pelo fato que a geração de EROS pela mitocôndria na presença de rotenona (que mantém o complexo I em constante estado reduzido) é largamente estimulado pela adição de succinato, que reduz a coenzima Q. No entanto, embora $O_2^{\bullet-}$ parecer ser gerado na maioria dos casos a nível da coenzima Q, é importante notar que a NADH – coenzima Q oxidoredutase é também um importante sítio de geração de $O_2^{\bullet-}$ (Kowaltowski & Vercesi, 1999).

6.4. Transição da permeabilidade mitocondrial e estresse oxidativo

A transição da permeabilidade mitocondrial (MPT) é uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna, tipicamente promovida pelo acúmulo excessivo de íons Ca^{2+} e estimulada por uma variedade de componentes e condições, dentre elas as espécies reativas de oxigênio. A permeabilização da membrana interna causada por MPT resulta na perda de componentes da matriz, prejuízo para o funcionamento mitocondrial, substancial inchaço da organela (figura 14), ruptura da membrana mitocondrial externa e liberação de citocromo c. A MPT é um processo parcialmente reversível, mediado por oxidações de proteínas de membranas e inibido por ciclosporina A. Sabe-se que nenhum novo poro na membrana interna é construído para mostrar as características de MPT. Então, a MPT é quase certamente causada por um grupo de componentes que já existem na membrana mitocondrial interna, porém, esses estão modificados (Kowaltowski & Vercesi, 1999; Kowaltowski *et al.*, 2001).

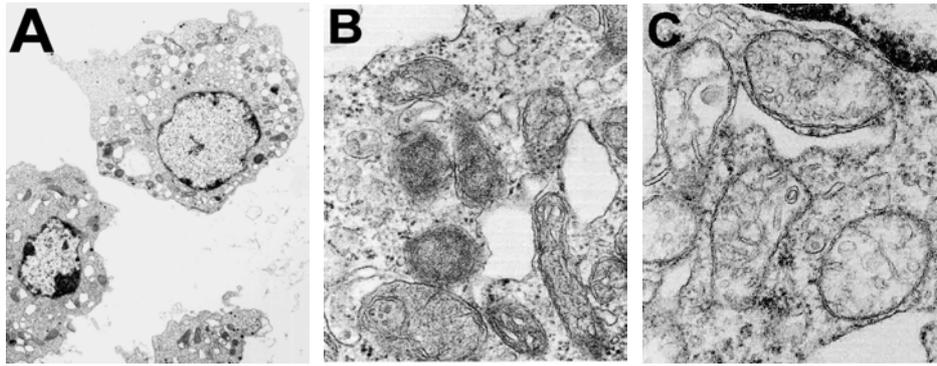


Figura 14: Células em meio de cultura (A) exibindo morfologia mitocondrial normal (B) e com mitocôndrias inchadas, após a transição de permeabilidade mitocondrial (C). Fonte: Kowaltowski, 2003.

A MPT está relacionada com o estado redox da mitocôndria e pode ser causada por espécies reativas de oxigênio (ROS) (figura 15). A CTE, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que são liberados na matriz mitocondrial. Esses radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), que promove a geração de H_2O_2 . A H_2O_2 é depois reduzida à água pela catalase ou pelas enzimas glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina peroxidase (TPx), sendo que essas duas últimas enzimas agem de forma conjunta. Para que ocorra a reação de redução do H_2O_2 em H_2O é necessário que a GPx oxide duas moléculas de glutathione (GSH) e que a (TPx) oxide duas moléculas de tioredoxina (TSH), formando respectivamente as formas oxidadas GSSG e TSST. Essas duas formas oxidadas são reconvertidas em GSH e TSH pelas enzimas glutathione e tioredoxina redutases (GR e TR), que usam NADPH como doador de elétrons originando a forma oxidada $NADP^+$. $NADP^+$ é reduzido por NADH com a utilização da proteína de membrana NADP transidrogenase (TH). Quando a geração de $O_2^{\bullet-}$ aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão de alguma forma inativados, ocorre um acúmulo de H_2O_2 que na presença de Fe^{2+} gera o radical hidroxila (OH^{\bullet}) que é altamente reativo. Então esse radical oxida os grupamentos tióis (-SH) do complexo de poros que irão gerar a MPT, levando assim a montagem e a abertura desses. Alternativamente, OH^{\bullet} pode promover a permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado pela presença de P_i (Kowaltowski *et al.*, 2001).

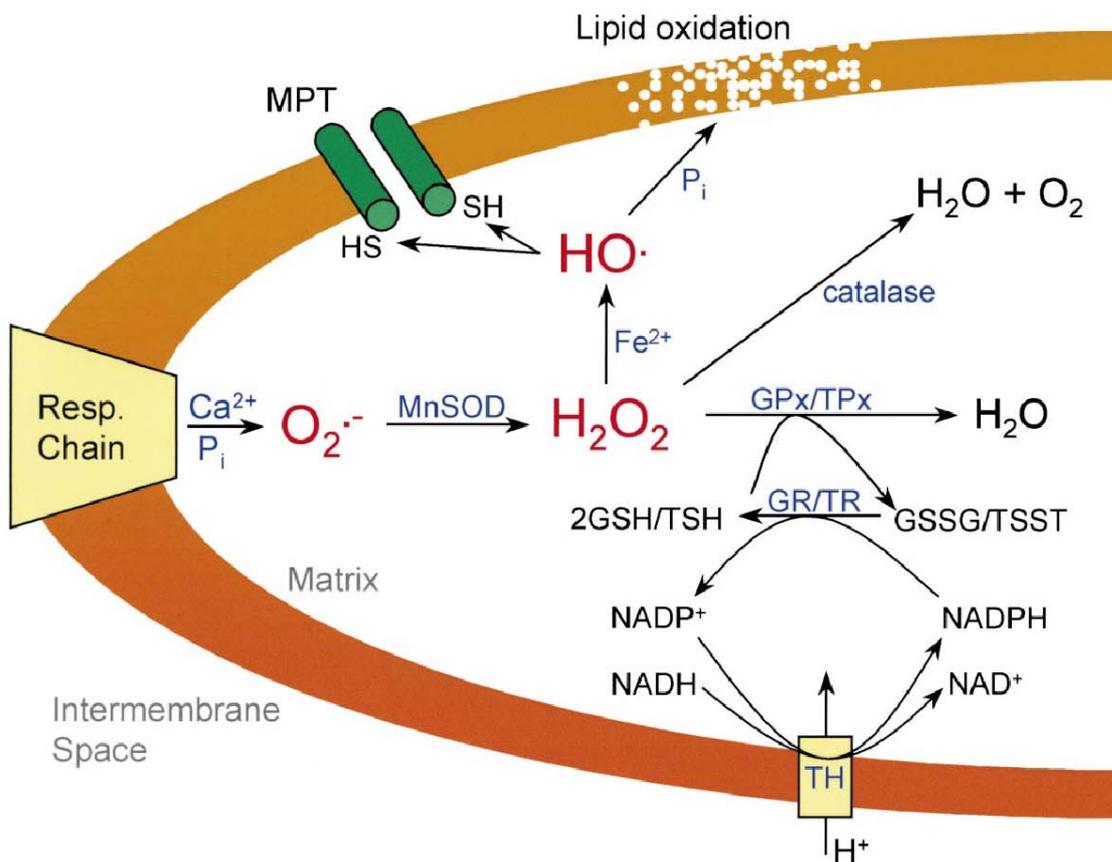


Figura 15: Mecanismos de produção/ detoxificação de ROS na matriz mitocondrial e suas relações com a geração de MPT. Fonte: Kowaltowski *et al.*, 2001.

MPT ocorrendo dentro das células pode ser uma maneira de eliminação de mitocôndrias individuais (“mitoptose”) quando ocorre uma produção excessiva de ROS. Assim, a MPT pode ser a última linha de defesa celular contra a geração de ROS pelas mitocôndrias (Kowaltowski *et al.*, 2001).

6.5. Papel da Mitocôndria na apoptose durante o envelhecimento

O envelhecimento é caracterizado por um aumento na produção de EROS nos tecidos somáticos, e um aumento nessa produção de EROS pode promover a indução da apoptose (figura 16). Várias evidências sugerem que o envelhecimento é acompanhado por alterações no processo apoptótico. Foi demonstrado que a super produção de

oxidantes pode induzir estresse oxidativo e morte celular. A mitocôndria é o principal sítio intracelular de produção de EROS. Assim, os altos níveis de oxidantes produzidos pelas mitocôndrias podem induzir apoptose pela mudança no potencial redox celular, exaustão na redução da glutatona, redução nos níveis de ATP e diminuição nos equivalentes de redução, tais como o NADH e NADPH. Essas mudanças podem facilitar a peroxidação lipídica e a abertura de poros de transição de permeabilidade, levando a subsequente liberação de citocromo c e de proteínas apoptogênicas no citosol. Assim, declínio na função respiratória, produção mitocondrial de EROS, estresse oxidativo e suscetibilidade á apoptose são os eventos centrais do processo do envelhecimento (Wei & Lee, 2002).

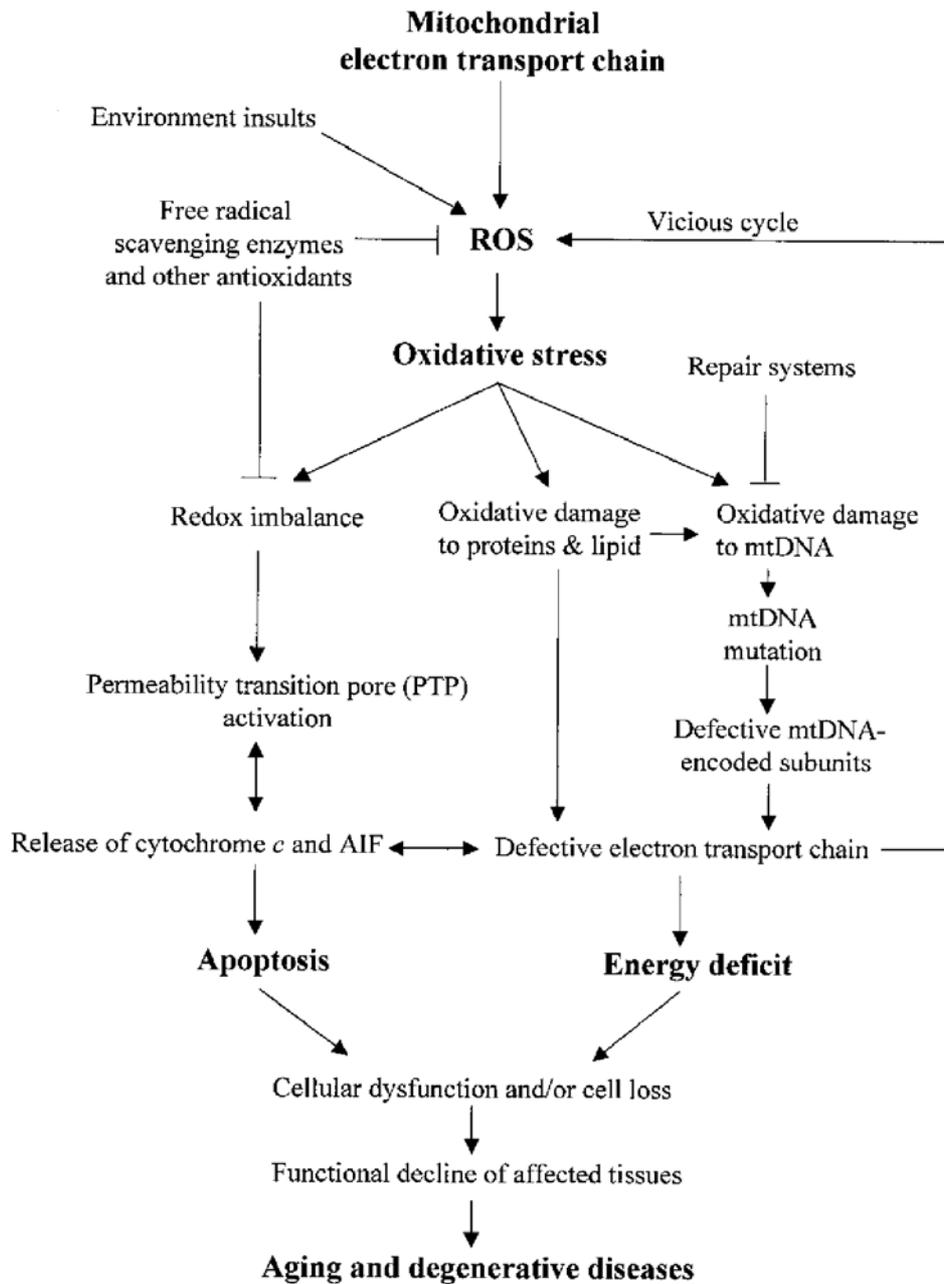


Figura 16: Papel da mitocôndria no envelhecimento e em doenças degenerativas associadas ao envelhecimento. Fonte: Wei & Lee, 2002.

A CTE na membrana mitocondrial interna, contém subunidades protéicas codificadas pelo mtDNA e pelo DNA nuclear, e está ativamente envolvida na síntese de ATP através da respiração que consome por volta de 90% do oxigênio que penetra nas células. Uma fração do oxigênio é incompletamente reduzida pela transferência de um elétron para geração de EROS e radicais livres orgânicos, que usualmente são degradados ou perdem sua atividade reativa pela ação dos antioxidantes. Se os radicais

livres não forem destoxificados, eles podem causar danos oxidativos em proteínas, lipídios e oxidações/mutações nas moléculas de mtDNA. O mtDNA com modificações oxidativas e/ou mutações são transcritos e traduzidos para produzir subunidades protéicas defeituosas que são unidas formando uma CTE defeituosa. A CTE defeituosa não somente trabalha menos eficientemente na síntese de ATP, mas isso também gera mais EROS, que irá aumentar ainda mais o dano a biomoléculas na mitocôndria. Esse ciclo vicioso é propagado, e causa estresse oxidativo e mutação no mtDNA, o que leva a um progressivo declínio na função bioenergética de tecidos em processo de envelhecimento. Por outro lado, enzimas antioxidantes, antioxidantes não enzimáticos e sistemas de reparo de DNA podem diminuir o estresse oxidativo e tornar menos eficiente o processo de envelhecimento. Em adição, altos níveis de oxidantes podem induzir apoptose pela mudança no potencial redox da célula, exaustão na redução de glutathiona, redução nos níveis de ATP e diminuição nos equivalentes de redução como o NADH e NADPH. Essas mudanças podem facilitar a peroxidação lipídica e a abertura do poro de transição de permeabilidade, levando a uma subsequente liberação de citocromo c e fator indutor de apoptose (AIF). Assim o acúmulo de danos oxidativos, mutações nas moléculas de mtDNA e mitocôndrias defeituosas, junto com o processo de apoptose, agem para causar o declínio geral das funções bioquímicas e fisiológicas nos tecidos em processo de envelhecimento (Wei & Lee, 2002).

6.6. A importância do Ca^{2+} , Pi e Fe

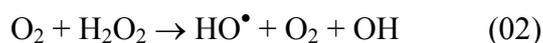
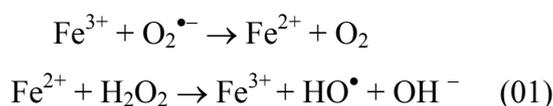
Alguns estudos sugerem que o Ca^{2+} e o Pi podem, sozinhos, levar a condição de estresse oxidativo na mitocôndria. De fato, mitocôndrias tratadas com Ca^{2+} e Pi tem um grande aumento na geração de EROS. Apesar disso, não existe nenhum entendimento de como o Pi, apesar de diminuir as concentrações de Ca^{2+} livre na matriz, aumenta a geração de EROS e estimula a MPT. Isso é possível se o Pi catalisar reações a favor da formação de EROS, o que realmente acontece, pois Pi tem a habilidade de catalisar a tautomerização de aldeídos produzindo enóis que, quando oxidados por proteínas produz aldeídos em estágio tripleto que são EROS por si mesmos (Kowaltowski *et al.*, 2001).

Estudos de indução do estresse oxidativo por Ca^{2+} em mitocôndrias cerebrais tratadas com rotenona (inibidor do complexo I) mostra que concentrações micromolares

de Ca^{2+} ($>10\mu\text{M}$) estimulam fortemente a liberação de EROS em cérebros tratados com rotenona. A estimulação da liberação de EROS pelo Ca^{2+} está diretamente ligada com o grau de inibição do complexo I da CTE pela rotenona. Por outro lado, Ca^{2+} não aumenta a liberação de EROS mitocondriais na presença do inibidor do complexo I da CTE 1-metil – 4 – fenilpirimidina. A ciclosporina A não tem nenhum efeito na liberação de EROS estimulada pelo Ca^{2+} na presença de rotenona, indicando que a MPT não envolve esse processo (Sousa *et al.*, 2003).

Uma hipótese que explica como o Ca^{2+} aumenta a formação de EROS mitocondrial é que o Ca^{2+} altera a organização dos lipídeos da membrana mitocondrial interna quando esse interage com a cabeça aniônica da cardiolipina, abundante componente nessa membrana (Kowaltowski *et al.*, 2001). Além da interação com a cardiolipina os íons Ca^{2+} estimulam a produção de radicais superóxido e de peróxido de hidrogênio, pela CTE; estimulam a reação de Fenton através da mobilização de Fe para matriz mitocondrial; e a formação de proteínas de membranas que regulam a abertura do poro da MPT (Maciel *et al.*, 2001). Essas alterações afetam a organização da membrana mitocondrial interna e conseqüentemente da CTE (Kowaltowski *et al.*, 2001).

O radical hidróxila é gerado através da interação entre o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 . Essa reação foi proposta por Fritz Haber junto com Joseph Weiss, em um trabalho publicado em 1934. Essa reação de Haber-Weiss é termodinamicamente desfavorável e necessita de um catalizador para poder ocorrer. A reação de Haber-Weiss (reação 01) catalizada pelo ferro, que faz uso da química de Fenton (reação 02), é considerada como o principal mecanismo de geração do radical hidroxila (Llesuy, 2002).



Além disso, o ferro e o cobre catalizam a clivagem de ROOH, levando a geração de OH^{\bullet} . Em humanos, o conteúdo de ferro aumenta com a idade (em homens ao longo

de toda a vida e em mulheres após a menopausa) e isso tem sugerido que esse acúmulo pode aumentar o risco de dano oxidativo com a idade (Beckman & Ames, 1998).

7. Síntese: Interação da geração de oxidantes, danos oxidativos e reparo

Existe uma relação entre os três componentes do estresse oxidativo (geração de oxidantes, proteção pelos antioxidantes e reparo do dano oxidativo), essa relação é mostrada na figura 17 (Beckman & Ames, 1998).

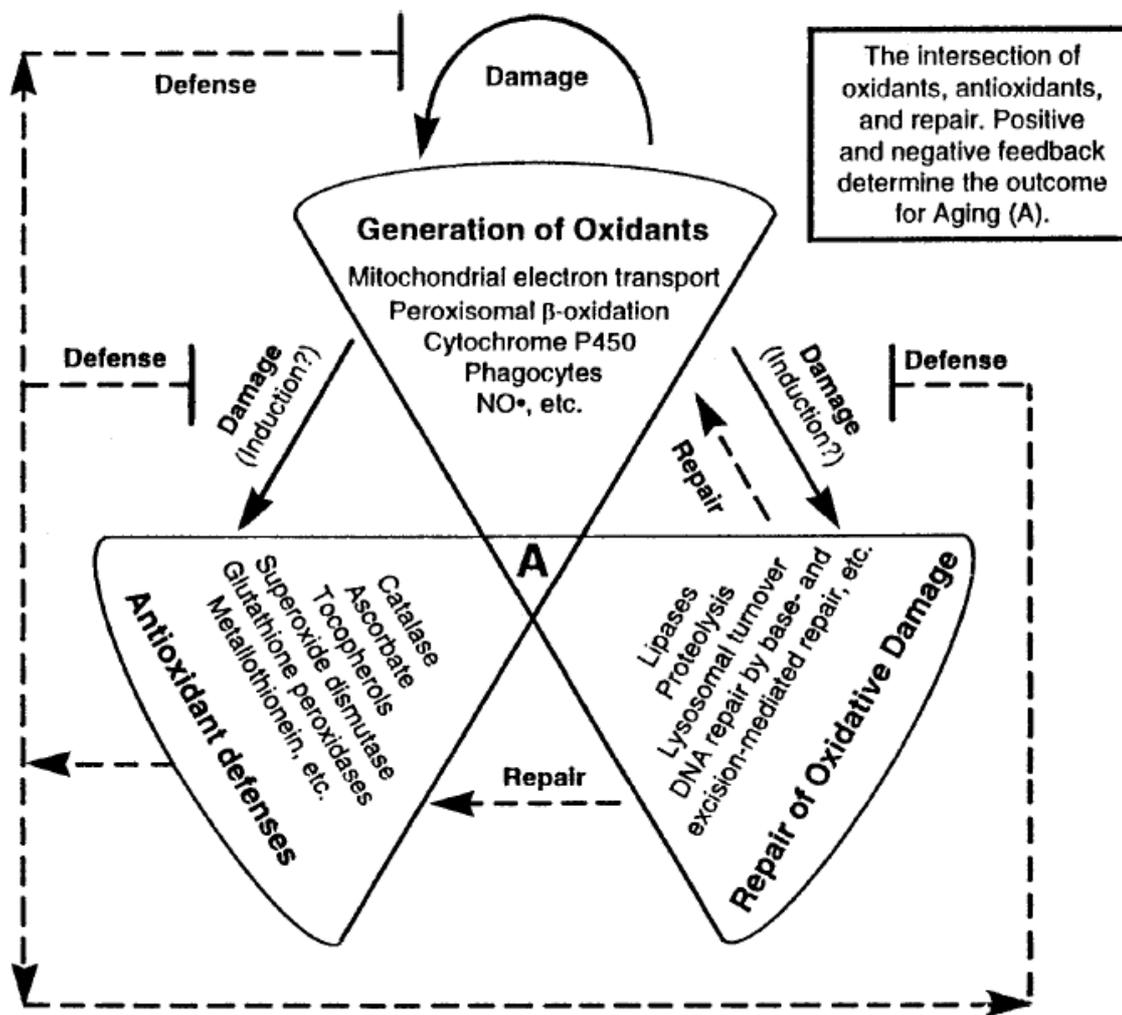


Figura 17: O estresse oxidativo é uma função da geração de oxidantes, defesas antioxidantes e reparo do dano oxidativo. As setas em negrito denotam o estresse oxidativo e as setas pontilhadas denotam as rotas de prevenção e reparo. Devido aos modos pelos quais esses processos podem interagir, múltiplos “feedbacks” negativos e

positivos são possíveis. O envelhecimento (A) está situado na interseção desses processos. Fonte: Beckman & Ames, 1998.

8. Restrição calórica.

Embora na década de 60 tenha sido observado que ratos de laboratório com uma diminuição da admissão calórica, porém, sem uma má nutrição, estendiam seus níveis máximos de vida, esse fenômeno permaneceu inexplorado até meados da década de 70 (Sohal & Weindruch, 1996).

A admissão limitada de comida, ou restrição calórica, tem sido foco de estudo por estender o tempo de vida em várias espécies (Finkel & Holbrook, 2000). Segundo Sohal & Weindruch (1996), o entendimento dos efeitos da restrição calórica é importante devido à eficácia desse regime na prolongação do tempo de vida máximo em mamíferos e também por causa de suas possíveis aplicações na saúde humana.

Masoro (1998), publicou uma revisão sobre os efeitos da restrição calórica no envelhecimento e nas respostas contra agentes estressantes. Ele concluiu que a atividade antienvhecimento da restrição calórica não é causada pela redução de gordura corporal nem pela mudança na taxa metabólica. Parece que a restrição calórica diminui o metabolismo de carboidratos e por isso tem sua atividade antienvhecimento (Fukagawa, 1999).

Embora várias teorias tenham avançado ao longo dos anos para explicar os efeitos antienvhecimento da admissão limitada de comida, a principal hipótese propõe que ocorre uma diminuição do estresse oxidativo (figura 18). Um suporte para essa teoria é que a taxa de geração de oxidantes é significativamente menor em ratos submetidos à restrição calórica do que em animais submetidos a uma dieta normal. Isso acontece porque a restrição calórica reduz o acúmulo de danos oxidativos associados ao envelhecimento, previne a mudança da expressão e transcrição de genes que normalmente ocorrem durante o envelhecimento, incluindo elevações na expressão de proteínas heat-shock e a atenua a expressão induzida por estresse de Hsp70 (Finkel & Holbrook, 2000). A restrição calórica também reduz a gordura corporal, atrasa mudanças neuroendócrinas e imunológicas, aumenta a capacidade de reparo do DNA, reduz a temperatura corpórea e diminui a taxa metabólica (Sohal & Weindruch, 1996). Finalmente, a restrição calórica aumenta a habilidade de alguns roedores de resistir a

A tabela 02 resume alguns estudos com animais onde se observa a eficácia da restrição calórica na redução de índices de injúria oxidativa.

Tabela 02: Estudos dos efeitos da restrição calórica na injúria oxidativa. Fonte: Fukagawa, 1999.

Espécies	Resultados
Camundongo ¹	60% de restrição preveniu o aumento dos níveis de o-o'-ditirosina em músculos cardíacos e esqueléticos, mas não previne o-tirosina
Macaco Rhesus ²	30% de restrição melhorou o aumento, associado ao envelhecimento, de certas citocinas, provavelmente induzidas pelo estresse oxidativo.
Rato ³	40% de restrição preveniu o aumento, associado ao envelhecimento, de deleções no mtDNA no fígado, mas não no cérebro.
Camundongo ⁴	40% de restrição atenuou o declínio, associado ao envelhecimento na massa muscular esquelética e reduziu o dano oxidativo a lipídeos e proteínas em mitocôndrias do tecido muscular esquelético.

1. Leeuwenburg *et al.*, 1997; citado em Fukagawa, 1999.

2. Kim *et al.*, 1997; citado em Fukagawa, 1999.

3. Kang *et al.*, 1998; citado em Fukagawa, 1999.

4. Lass *et al.*, 1998; citado em Fukagawa, 1999.

9. Restrição calórica e seus efeitos no estado reduzido da célula

Como já citado anteriormente, a quantidade de macromoléculas modificadas oxidativamente aumenta com a idade em tecidos de uma variedade de espécies diferentes e esse dano irá depender do balanço entre oxidantes e antioxidantes.

O estado redox das células reflete esse balanço entre oxidantes e antioxidantes e esse estado é determinado pela quantificação da taxa de interconversão de vários complexos redox (quantidades das formas reduzidas e das formas oxidadas). Por exemplo: (i) glutatona na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), (ii) NADH e NAD⁺ e (iii) NADPH e NADP⁺. Entretanto, o complexo redox da glutatona é mais abundante do que qualquer outro complexo, além disso, ele está metabolicamente ligado a outros complexos redox por doação direta ou indireta de equivalentes redutores para as formas oxidadas. Então o complexo redox da glutatona é considerado um indicador

representativo do estado redox nos tecidos. A forma oxidada dessa molécula pode interagir com grupamentos cisteína de proteínas e forma ligações dissulfídicas entre a proteína e a glutathione formando proteína-SSG, essa reação é conhecida como S-tiologia ou glutatiologia (Rebrin *et al.*, 2003).

Rebrin *et al.* (2003), realizaram um estudo sobre os efeitos do envelhecimento e da restrição calórica no estado redox da glutathione em ratos. O objetivo desse estudo foi caracterizar o estado redox da glutathione em uma variedade de tecidos diferentes de ratos, comparar o estado redox da glutathione e o conteúdo de proteína-SSG em tecidos homogeneizados e nas suas respectivas mitocôndrias, em animais com diferentes idades, alimentados normalmente ou sobre restrição calórica. Através desse estudo eles utilizaram o estado redox da glutathione e o conteúdo de proteína-SSG para determinar se o desbalanço entre oxidantes e antioxidantes aumenta durante o processo de envelhecimento.

Foram feitas comparações entre as mudanças no estado redox da glutathione relacionadas com a idade e no conteúdo de proteínas-SSG em tecidos homogeneizados e nas mitocôndrias de seis órgãos diferentes de ratos C57BL/6Nnia. Os órgãos utilizados foram o fígado, rins, cérebro, coração, olhos e testículos de ratos bem alimentados com 04, 10, 22 e 26 meses de idade. E, fígado, rins, cérebro, coração, olhos e testículos de ratos alimentados com uma dieta contendo 40% menos de calorias do que o grupo bem alimentado com 04 meses de idade.

Os principais resultados desse estudo foram: (i) a GSH, GSSG, conteúdo de proteínas-SSG e a relação entre GSH:GSSG varia em diferentes tecidos e também exibe uma disparidade entre as mitocôndrias e seus respectivos tecidos homogeneizados; (ii) a relação entre a GSH:GSSG nas mitocôndrias e nos tecidos homogeneizados diminui durante o envelhecimento, primeiramente devido a um relativo aumento na concentração de GSSG; (iii) o potencial redox mitocondrial torna-se menos negativo durante o envelhecimento, refletindo as taxas de oxidações; (iv) o conteúdo de proteínas-SSG aumenta com a idade em alguns tecidos homogeneizados e nas mitocôndrias de todos os tecidos examinados e (v) a restrição calórica diminui a magnitude das alterações relacionadas com o envelhecimento relativas ao estado redox da glutathione e ao conteúdo de proteínas-SSG, nos tecidos homogeneizados e nas mitocôndrias. Assim foi observado que mudanças nas quantidades de GSH, GSSG, proteína-SSG e na relação entre GSH:GSSG, associadas ao envelhecimento,

demonstram que esse fenômeno está associado com uma significativa taxa de oxidação de todos os órgãos dos ratos examinados nesse estudo.

Conclusão

Embora o papel clássico da mitocôndria na geração de ATP pelo metabolismo aeróbico tenha sido estabelecido por mais de meio século, a outra face da participação mitocondrial no envelhecimento em doenças humanas não era conhecida por volta de 15 anos atrás. Recentemente observou-se que a mitocôndria não é somente o sítio metabólico de produção de energia em organismos aeróbicos, mas também é o principal sítio intracelular de produção EROS os quais são gerados pela cadeia respiratória. Como a maior produção intracelular de EROS ocorre nas mitocôndrias, essa organela e seus constituintes, incluindo o mtDNA, são particularmente vulneráveis ao dano oxidativo.

Sob condições fisiológicas normais, as EROS geradas pela cadeia respiratória podem ser eliminadas pelas defesas antioxidantes enzimáticas, e não enzimáticas prevenindo assim os danos oxidativos nas células. Entretanto, como resultado do envelhecimento, ocorre um aumento na produção de EROS pela cadeia respiratória e uma diminuição nas concentrações de antioxidantes, conseqüentemente ocorre dano oxidativo e apoptose.

Como se sabe que no envelhecimento há um declínio da capacidade antioxidativa, algumas medidas podem ser preventivas e minimizar o seu efeito. Por exemplo: (i) suplementação dietética dos antioxidantes, (ii) redução da ingestão de gorduras insaturadas, (iii) exercícios físicos moderados e ritmicamente adaptados (sem estresse, esforço aeróbico intenso ou destreinado), (iv) não exposição a poluentes, (v) não exposição a radiações e (vi) evitar o uso direto e indireto do cigarro, pelos efeitos carcinogênicos do tabaco e a elevação da temperatura.

Ainda que as relações entre as modificações oxidativas, mutação no mtDNA, disfunção mitocondrial e envelhecimento tenham emergido, o mecanismos detalhados pelos quais esses eventos bioquímicos e moleculares causam o envelhecimento humano permanecem não totalmente elucidados. Assim o entendimento das mudanças relacionadas com o envelhecimento na estrutura e funcionamento da mitocôndria durante esse processo é um ponto crítico para a elucidação das bases moleculares do envelhecimento e para uma melhor administração desse fenômeno e das doenças relacionadas a ele.

Bibliografia

AUDABERT, M., CHARBONNIER, J. B., BOITEUX, S. & RADICELLA, J. P. (2002). Mitochondrial targeting of human 8 – oxoguanine DNA glycosylase hOGG1 is impaired by a somatic mutation found in kidney cancer. *DNA Repair*. **1**: 497-505.

BECKMAN, K. B. & AMES, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, **32**: 19633-19636.

BECKMAN, K. B. & AMES, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, **78**: 547-581.

BELLÓ – KLEIN, A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: MARRONI, N.P. *et al. Estresse oxidativo e antioxidantes*. 1ª ed., editora Ulbra, Porto Alegre, 2002. p.15-19.

BERLETT, B. S. & STADTMAN, E. R. (1997). Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, **33**: 20313-20316.

BRANCHAUD, B.P. Free radicals as a result of dioxygen metabolism. In: SIGEL, A. & SIGEL, H. *Metal ions in biological systems*. Vol.36. 1ª ed., editora Marcel Dekker, New York, 1999. p. 79-102.

CAMPELL, M. K. *Bioquímica*. Tradução Henrique Bunselmeyer Ferreira *et al.* 3ªed., editora Artmed, Porto Alegre, 2000. 751p.

CROUTEAU, D. L. & BORH, V. A. (1997). Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 25409-25412.

DELVIN, T. M. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. Traduzido por Yara M. Michelacci. 4ªed., editora Edgard Blücher, São Paulo, 1998. 1007p.

- FERREIRA, C. P. *Bioquímica básica*. 5ªed., editora MNP, São Paulo, 2003. 453p.
- FERREIRA, T. C. *Morte celular na levedura *Saccharomyces cerevisiae* promovida pelo ácido linoleico: efeitos bioquímicos e morfológicos*. Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2002.
- FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**: 239-247.
- FUKAGAWA, N. K. (1999) Aging: oxidative stress a marker or Is it causal? *Experimental Biology and Medicine*, **222**: 293-298.
- FRIDOVICH, I. (1998). Oxygen toxicity: A radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, **201**: 1203-1209.
- GONZÁLES, D. C. *et al. Bioquímica do envelhecimento*. Disponível em : www.usp.br. Acesso em 10 de agosto de 2003.
- HARRIS, N. G. Nutrição do envelhecimento. In: MAHAN, L. K. e SCOTT-STUMP, S. *Alimentos Nutrição e dietoterapia*. 1ªed., editora Roca, São Paulo, 2002. p. 276-293.
- JR, G. F. C. Vitaminas. In: MAHAN, L. K. e SCOTT-STUMP, S. *Alimentos nutrição e dietoterapia*. 1ªed., editora Roca, São Paulo, 2002. p. 65-105.
- LANE, P. M., INGRAM, D. K. & ROTH, G. S. (2002). A fonte da juventude. *Scientific American Brasil*, **03**: 68-73.
- KOWALTOWSKI, J. Alicia. *Regulação da vitalidade celular por mitocôndrias*. Disponível em: www.iq.usp.br/wwwdocentes/alicia. Acesso em 15 de setembro de 2003.
- KOWALTOWSKI, J. Alicia, CASTILHO, R. F. & VERCESI, A. E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *Federation of European Biochemical Societes*. **495**: 5-12.

KOWALTOWSKI, J. Alicia & VERCESI, A. E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. **3**: 463-471.

LLESUY, S. F. Introdução y espécies activas de oxígeno. In: MARRONI, N.P. *et al.* *Estresse oxidativo e antioxidantes*. 1ª ed., editora Ulbra, Porto Alegre, 2002. p.21-32.

MACIEL, E. N., VERCESI, A. E. & CASTILHO, R. E. (2001). Oxidative stress in Ca²⁺ - induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *Journal of Neurochemistry*. **79**: 1237-1245.

MANDAVILI, S. B., SANTOS, J. H. & HOUTEN, B. V. (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research*, **509**: 127-151.

MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A. & RODWELL, V. W. *Harper: Bioquímica*. Traduzido por Ezequiel Waisbich *et al.* 9ªed., editora Atheneu, São Paulo, 2002. 919p.

MENEGHINI, R. (1987). A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*, **28**: 57-62.

NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger Princípios de bioquímica*. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões & Wilson Roberto Navega Lodi. 3ª ed., editora Sarvier, São Paulo, 2002. 975p.

PRYOR, W. A. *Introdução ao estudo dos radicais livres*. 1ªed., editora Edgard Blucher, São Paulo, 1970. 72p.

REBRIN, I., KAMZALOV, S. e SOHAL, R. S. (2003). Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radical Biology & Medicine*, **35**: 626-635.

RENZ, S. V. *Oxidação e antioxidantes*. Disponível em: www5.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/oxi_antiox.pdf. Acessado em 26 de agosto de 2003.

SANTOS, N.C.F. *Quantificação da ação antioxidante do piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH) contra o estresse oxidativo induzido por íons ferro*. Universidade de Brasília, Brasília – DF, 1998.

SERGENT, O., MOREL, I. & CILLARD, J. Involvement of metal ions in lipid peroxidation: Biological implications. In: SIGEL, A. & SIGEL, H. *Metal ions in biological systems*. Vol.36. 1ª ed., editora Marcel Dekker, New York, 1999. p. 79-102.

SOUSA, C. S., MACIEL, E. N., VERCESI, A. E. & CASTILHO, R. F. (2003). Ca²⁺ - induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. *Federation of European Biochemical Societies*, **543**: 179-183.

STADTMAN, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, **257**: 1220-1224.

STRYER, L. *Bioquímica*. Traduzido por Wilson Roberto Navega Lodi *et al.* 4ªed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996. 1000p.

TORTORA, G. J. & GRABOWSKI, S. R. *Princípios de anatomia e fisiologia*. Traduzido por Alexandre Lins Werneck *et al.* 1ªed., editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002. 1047p.

TROEN, B. R. (2001). The biology of aging. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, **70**: 8-23.

TUÑÓN, M. J. & JIMÉNEZ, R. Envejecimiento y estrés oxidativo. Papel de los antioxidantes. In: In: MARRONI, N.P. *et al.* *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. 1ª ed, editora Ulbra, Porto Alegre, 2002. p.21-32.

VOET, D & VOET, G. *Fundamentos de bioquímica*. Traduzido por Arthur Germano Fett Neto, *et al.* 1ªed., editora ArtMed, Porto Alegre, 2000. 931p.

WALLACE, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**: 1482-1488.

WEI, Yau-Huei & LEE, Hsin-Chen. (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental Biology and Medicine*, **227**: 671-682.

WISEMAN, H. & HALLIWELL, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species; role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemistry. Journal*, **313**: 17-29.

