

OXIDAÇÃO E ANTIOXIDANTES*

Introdução

O elemento oxigênio se encontra em 53,8% da crosta terrestre e este composto constitui cerca de 21% da composição do ar. Este composto também é considerado indispensável para a produção eficiente de energia tanto nos animais como nas plantas. Existe porém um paradoxo, pois o oxigênio, assim como é indispensável para a vida, pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis quando seres vivos são expostos a ele em concentrações superiores às encontradas na atmosfera, podendo inclusive levar a morte celular. Por isto, com a evolução dos seres vivos no planeta, surgiram mecanismos para combater estes efeitos deletérios. São os mecanismos antioxidantes, compostos de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos.

Estes efeitos deletérios sobre os seres vivos podem variar consideravelmente conforme o tipo de organismo, seu estado fisiológico, suas defesas antioxidantes e sua dieta, assim como diferentes tecidos de um mesmo ser vivo reagem e são afetados diferentemente por estes efeitos.

Oxidação

Os efeitos tóxicos relacionados ao oxigênio já são conhecidos desde o final de século XIX, mesmo assim, a identificação dos radicais livres causadores desta toxicidade somente foi possível há cerca de 50 anos, quando Denham Harman lançou sua teoria sobre o envolvimento destes radicais livres em processos de mutagênese, câncer e envelhecimento.

Estas pesquisas foram aprimoradas com a descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD), em 1969. A partir de então, diversas foram as pesquisas visando elucidar os efeitos dos radicais livres nas células biológicas.

É difícil fazer uma medição direta da oxidação nos componentes celulares devido a sua alta reatividade, porém é possível uma determinação indireta pelos efeitos por eles causados, através da oxidação dos lipídios, dos grupamentos sulfidril das proteínas, das bases púricas e pirimídicas, o que leva a uma alteração no DNA e no balanço tiol/dissulfeto.

* Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, pelo aluno SANDRO VOLNEI RENZ, no primeiro semestre de 2003. Professor responsável: Félix H. D. González.

Conceito de oxidação

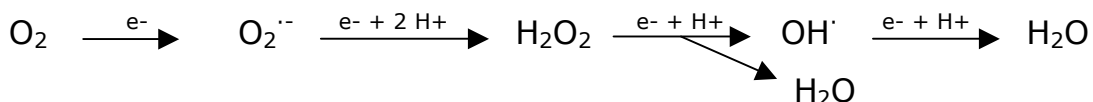
As espécies reativas do oxigênio estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres.

Radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula, e de meia vida curta.

A formação deste compostos é determinada pela perda ou ganho de um elétron, ficando com um elétron desemparelhado. A formação destas espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre durante os processos oxidativos biológicos, sendo assim formados fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos. Da mesma forma, podem ser oriundos do metabolismo de alguns compostos exógenos ao organismo, gerando assim diferentes radicais livres. Dentre estes processos podemos destacar a fosforilação oxidativa, reação responsável pela geração de energia ao organismo através do ATP na mitocôndria.

Formação dos ROS

Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$).



Conforme visto do esquema acima, o ânion radical superóxido é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, sendo formado a partir dele os demais ROS. Algumas outras reações de formação de ROS nas mitocôndrias podem ser acompanhadas nas equações a seguir:

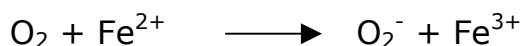
Oxidação da semiquinona a partir da ubiquinona:



Oxidação da semiquinona a partir da flavina da NADH desidrogenase:



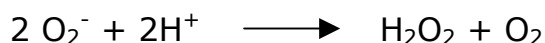
Reações de formação de ROS no retículo endoplasmático a partir da citocromo P₄₅₀ e a partir da flavoproteína NADPH-citocromo P₄₅₀ redutase:



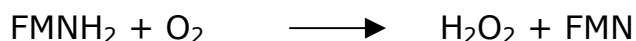
Reações de formação de ROS no citosol pela enzima xantina oxidase:



Reações de geração dos peróxidos de hidrogênio nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, nos peroxissomas e no citosol, sendo que nas mitocôndrias esta reação é catalisada pela superóxido dismutase (SOD):



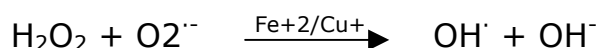
No retículo endoplasmático o H₂O₂ é gerado quimicamente pela autooxidação do citocromo P₄₅₀ (FMNH₃) da citocromo c NADPH redutase:



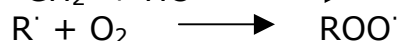
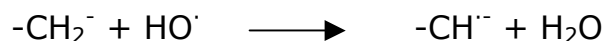
O ROS podem ainda ser formados pelas reações enzimáticas da ciclooxigenase, lipooxigenase, aldeído oxidase, além da autooxidação das catecolaminas, flavinas e ferridoxinas e pelas reações catalizadas por metais de transição como o ferro e o cobre, entre outras.

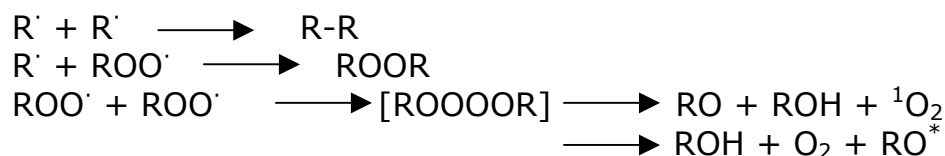
A partir destas O₂^{·-} e H₂O₂ podem surgir outras ROS, como o radical HO[·].

O radical hidroxila é uma dos mais potentes oxidantes, tendo a capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas tais como lipídios insaturados e DNA. Ele pode ser formado de outras formas, conforme pode ser visto abaixo:



A peroxidação lipídica é definida como a deterioração oxidativa dos lipídios poliinsaturados. Ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que contém ligações duplas entre carbonos. Tanto as membranas celulares como as organelas (mitocôndrias, peroxissomas) contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados que poderiam ser peróxidos. Estas reações ocorrem em 3 etapas: a iniciação, a propagação e a terminação (quando os radicais gerados reagem entre si). Algumas reações estão demonstradas abaixo:





Patogenia da ação dos ROS

Há muitas evidências de influências dos ROS em doenças degenerativas, como ocorre na catarata, enfisema, artrite, doença de Parkinson, diabetes, mutação, câncer e envelhecimento (Figura 1). A forma como ocorrem estas doenças podem ser assim classificadas: 1) Estresse oxidativo mitocondrial, quando ocorre um desequilíbrio do estado redox sistêmico (balanço tiol/dissulfeto) e uma depuração prejudicada de glicose, sugerindo que a mitocôndria do músculo esquelético seja o principal sítio de geração de ROS; 2) Condição oxidativa inflamatória, quando há uma estimulação excessiva da atividade da NADPH oxidase por citocinas e outros agentes.

A vida na aerobiose é caracterizada por uma constante produção destes radicais livres, a qual é contrabalanceada com uma produção equivalente de mecanismos antioxidantes visando neutralizar seus efeitos deletérios. Quando esta neutralização não é possível devido a uma sobrecarga do mecanismo antioxidantes, dizemos que há uma situação de estresse oxidativo, levando a geração de diversos danos aos sistemas biológicos. Frente a um estresse oxidativo, ocorrem os seguintes processos: 1) adaptação, por aumentos da resposta antioxidante; 2) dano tecidual por agressão à lipídios, carboidratos e proteínas; 3) morte celular por necrose ou apoptose. As principais afecções envolvidas com a oxidação de componentes celulares são apresentadas na figura a seguir (Figura 1).

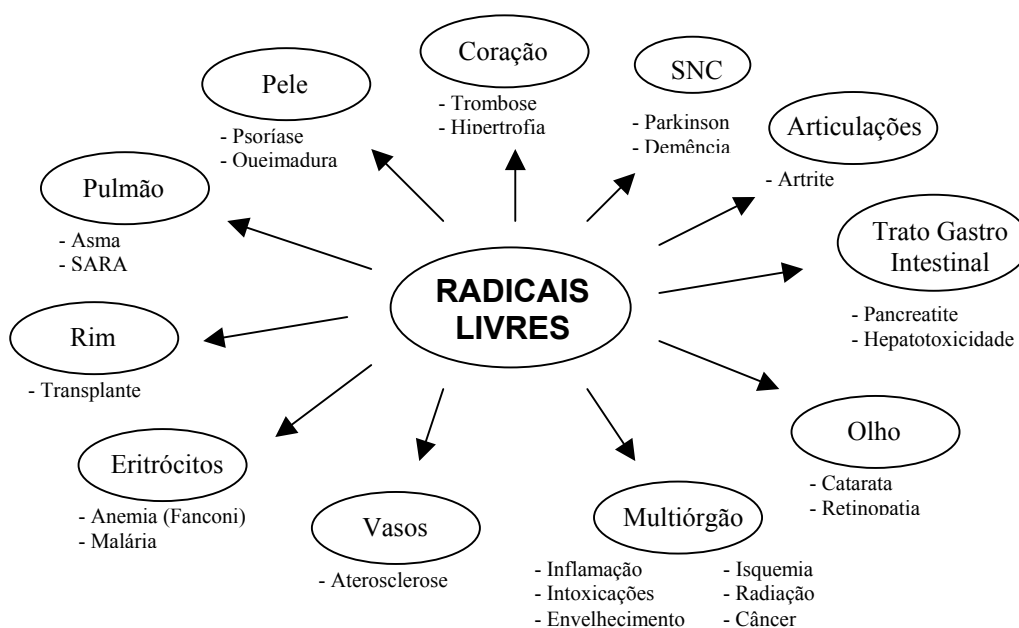


Figura 1. Doenças associadas às ROS

Um dos danos causados às lipoproteínas de baixa densidade estão ilustrados na Figura 2.

A nível molecular, os ROS agem da seguinte forma: oxidação de componentes tiol vitais em dissulfetos, perda de GSH tecidual, desregulação da geração de energia (ATP, NADH, NADPH), inibição do transporte do cálcio e homeostase eletrolítica, oxidação dos citocromos, clivagem de DNA em linha e promoção e início de processos mutantes e carcinogênicos.

Efeitos benéficos dos radicais livres

Porém, há relatos também de efeitos benéficos causados pelos radicais livres, como ocorre com o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, que podem estimular a produção de segundos mensageiros como o GMPc, e o óxido nítrico (NO), que age no relaxamento da musculatura lisa vascular e na inibição da adesão plaquetária. Por isto, nos últimos anos estão sendo realizadas pesquisas no sentido de elucidar as adaptações dos organismo aos agentes oxidantes e os mecanismos desenvolvidos para obter vantagens dos mesmos e de seus derivados, como a regulação do tônus vascular, percepção da tensão de oxigênio e regulação das funções que são controladas pela tensão de oxigênio (produção de eritropoietina), aumento da transdução de sinal a partir

de vários receptores de membrana, incluindo o receptor de antígeno dos linfócitos e respostas do estresse oxidativo que garantem a manutenção da homeostase redox.

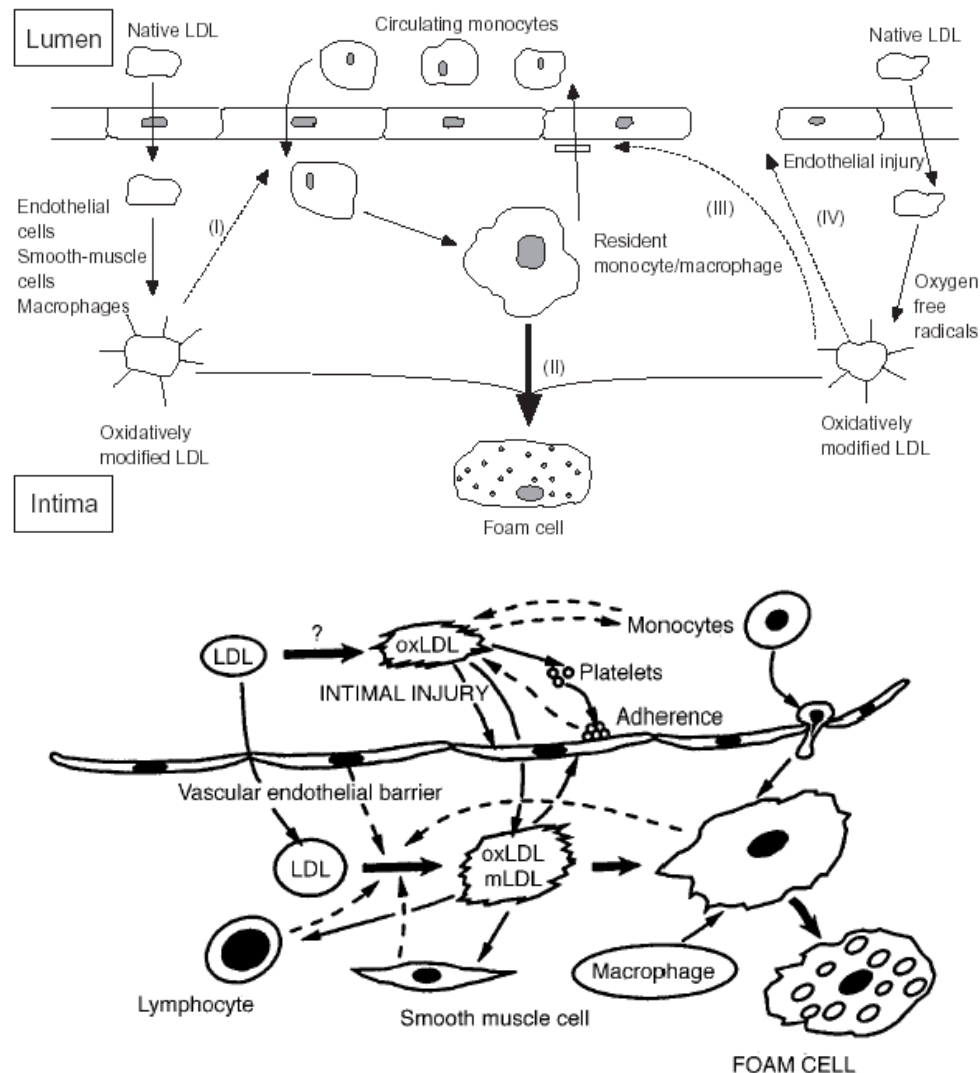


Figura 2. Modelo hipotético de aterogênese a lipoproteínas de baixa densidade.

Antioxidantes

Para evitar os danos causados pelos ROS, 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 quantidade suficientes para neutralização os efeitos dos

radicais livres normalmente produzidos. Quando esta equivalência não existe, dizemos que está ocorrendo um estresse oxidativo.

O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura dos ROS, sequestro dos metais catalizadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo. Os mecanismos de alguns antioxidantes podem ser acompanhados na Figura 3.

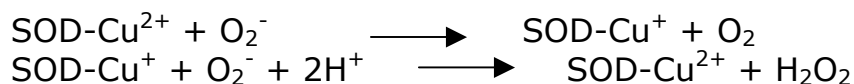
Classificação e mecanismos de ação dos antioxidantes

Os antioxidantes podem ser classificados como *enzimáticos* e *não enzimáticos*, conforme a estrutura do agente antioxidante. 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.

Sistema enzimático

O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo de ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx).

A *superóxido dismutase (SOD)* age transformando dois ânions radicais superóxidos em um peróxido de hidrogênio, a qual é uma reação normal em pH fisiológico porém muito acelerada através desta enzima. Possui meia vida curta (menos de 10 minutos) e não penetra nas células. A SOD pode ocorrer de três formas, dependendo do metal associado a mesma (Cu e Zn no citoplasma de eucariontes, Mn na matriz mitocondrial e Fe em bactérias). As equações abaixo demonstram as reações catalizadas pela SOD:



A SOD-Mn é um homotetrâmero que é reduzido ao estado de oxidação III para o II e depois é novamente oxidado a III.

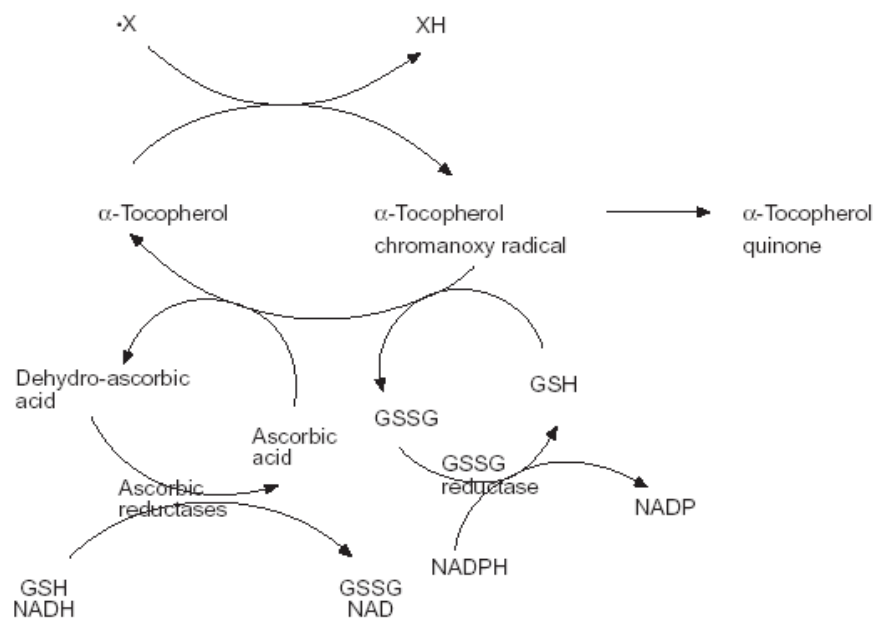


Figura 3. Mecanismos de Ação do sistema antioxidante Ascorbato-Tocoferol-GSH

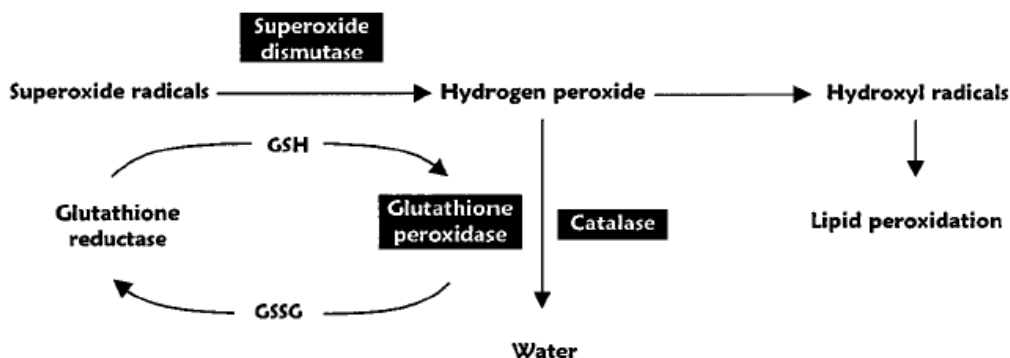
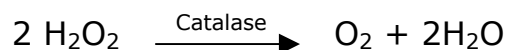


Figura 4. Sistema Enzimático antioxidante.

Outro antioxidante enzimático é a catalase, a qual possui a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Sua localização está nos peroxissomas, tendo por isto ação diminuída em órgãos como o coração, pulmão e o cérebro (possuem pouco peroxissomas). Nestes órgãos a ação antioxidante por esta enzima ocorre quando os radicais livres atingem a circulação sanguínea, através da catalase eritrocitária.



Além de ser um doador de elétrons, em mamíferos o H_2O_2 também pode ser desintoxicado por outra enzima além da catalase, é a glutathione peroxidase (GPx), localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Sua ação ocorre através da redução do

peróxido de hidrogênio e de hidropeptídeos orgânicos através da utilização da glutathion (GSH), o qual é um tripeptídeo de ácido α -glutâmico, cisteína e glicina que atua como co-substrato da glutathion peroxidase, com propriedade de doador de elétrons, a qual poderá ser regenerado através da glutathion redutase (GR) com o transferência de hidrogênio do NADPH. Assim, neste processo são transferidos dois hidrogênios dos grupamentos sulfidrilas para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, resultando em glutathion dissulfeto (GSSG). A glutathion peroxidase geralmente ocorre associada ao Se, mas pode ocorrer independente do mesmo. Os principais locais de ação são o fígado e eritrócitos, podendo ocorrer também no coração, pulmões e músculo.

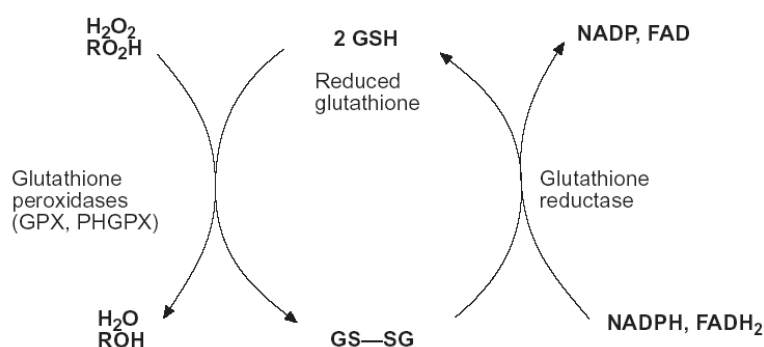
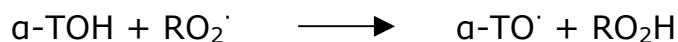


Figura 5. Mecanismo de ação do complexo glutathion.

Ainda há as enzimas chamadas glutathion-S-transferases, as quais agem detoxificando agentes alquilantes, incluindo herbicidas, pesticidas e xenobióticos, através da catalização das reações destes agentes com o grupo SH da glutathion, neutralizando-os e tornando-os mais facilmente metabolizáveis.

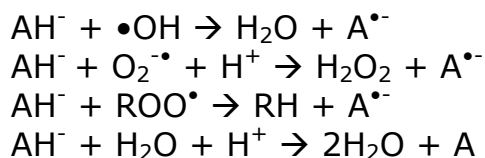
A outra parte da defesa contra os agentes oxidativos é a defesa não enzimática. Estas podem ser divididas em antioxidantes hidrofílicos (glutathion, vitamina C, indóis, catecóis) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina A, vitamina E). Entre os primeiros, a vitamina C tem ação como “scavengers” e também regeneradora da vitamina E (tocoferol). Como é hidrossolúvel (vitamina C), possui ação maior no plasma sanguíneo, enquanto que a vitamina E tem ação maior em membranas celulares, por ser lipossolúvel. O ácido úrico também tem ação antioxidante pela capacidade dos uratos de sequestrar radicais livre. Os estrógenos também são considerados antioxidantes pela sua ação como “scavengers”, inibindo a oxidação lipídica das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) iniciada pelos ROS. A reação da vitamina E (tocoferol) esta esquematizada abaixo:



Já o radical resultante pode reagir com outro radical peroxilo para resultar em produtos não radicais. O α -tocoferol também pode sequestrar e reagir com $^1\text{O}_2$, protegendo as membranas dessa espécie. Tanto o ácido ascórbico como o ubiquinol podem reciclar a vitamina E, sendo que o primeiro é o de maior importância nos seres vivos.

Já os carotenóides são um grupo de compostos onde se destacam os β -carotenos, precursores da vitamina A no intestino. Na circulação, junto com as lipoproteínas absorvidas na superfície intestinal, os carotenóides agem como sequestrantes de lipoperóxidos, principalmente.

O ácido ascórbico (vitamina C) tem ação antioxidante não enzimática através do ascorbato, o qual tem propriedade doadora de elétrons:



Há relatos da influência dos hormônios tireoideanos sobre o estresse oxidativo. É sabido que os mesmos regulam o metabolismo de muitos tecidos, como o músculo esquelético e cardíaco, fígado, rim e cérebro, através de um aumento no consumo de oxigênio, produção de calor e modulação de reações do metabolismo intermediário, aumento da frequência e força das contrações cardíacas e pressão arterial. Esta maior função mitocondrial pelo aumento do consumo de oxigênio e maior fosforilação oxidativa levam a uma maior produção de ROS. Assim, uma deficiência em hormônios tireoideanos (hipotireoidismo) leva a uma produção diminuída de ROS. Com este trabalho foi demonstrado o efeito regulatório de radicais livres através do nível de hormônios tireoideanos através da relação GSH/GSSG e nível de GR, os quais estavam todos aumentados em hipotireoideos e voltou aos níveis normais após a aplicação exógena de T3.

Referências bibliográficas

- ARAÚJO, A. S. R. **Influência do Hipotireoidismo no Dano Oxidativo e nas Defesas Antioxidantes**. Porto Alegre: Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
- BELLÓ, A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ulbra., 2002. p.15-19.
- BELLÓ, A. Estresse Oxidativo no Coração Adaptado. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ulbra., 2002 p.49-61.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2.a Ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 446p.
- EVELSON, P. A. Estrés Oxidativo y Apoptosis. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ultra, 2002 p.153-162.
- GONZÁLEZ, P.; MAURIZ, J. L.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Shock Hemorrágico y Radicales Libres: Papel Protector de la Glicina. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ulbra., 2002 p.63-78.
- KOOLMAN, J.; RÖHM, K. **Color Atlas of Biochemistry**. Thieme Medical Publishers, 1996. 435p.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. 2.a Ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- LLESUY S. F. Introducción y Espécies Activas de Oxígeno. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ulbra., 2002 p.21-32.
- MARRONI, N. P.; MARRONI, C. A. Estresse Oxidativo e a Mucosa Gastrintestinal. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ulbra., 2002 p.33-48.
- MATTSON, M. P.; CHAN, S. L.; DUAN, W. Modification of Brain Aging and Neurodegenerative Disorders by Genes, Diet, and Behavior. **Physiol.Rev.** v. 82, p.637-672. 2002.
- MENEZHINI, R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje** v.5, p.57-62, 1987.
- MURRAY, R. K. et al. **Harper: Bioquímica**. 7.a Ed. São Paulo: Atheneu Editora., 1994. 763p.
- PORAWSKI, M. Poluição e Estresse Oxidativo. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ulbra., 2002 p.15-19.
- SANCHÉZ, P; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. La melatonina en la Reducción de Estrés Oxidativo. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ulbra., 2002 p.163-176.
- TUÑÓN, M. J.; JIMÉNEZ, R. Envejecimiento y Estrés Oxidativo. Papel de los Antioxidantes. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ulbra., 2002 p.131-152.
- BASU, T.K.; TEMPLE, N.J.; GARG, M.L. **Antioxidants in Human Health and Disease**. London: British Library, 1999.