

# A FORMAÇÃO E OS EFEITOS DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO MEIO BIOLÓGICO

## THE FORMATION AND THE EFFECTS OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES IN BIOLOGICAL MEDIA

*Sônia Machado Rocha RIBEIRO<sup>1</sup>; José Humberto de QUEIROZ<sup>2</sup>; Maria do Carmo Gouveia PELÚZO<sup>3</sup>; Neuza Maria Brunoro COSTA<sup>3</sup>; Sérgio Luis Pinto da MATTA<sup>4</sup>; Maria Eliana Lopes Ribeiro de QUEIROZ<sup>5</sup>*

**RESUMO:** O oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons pelos organismos aeróbicos, porque permite elevada produção de energia na respiração, em consequência de seu alto potencial eletroquímico. Entretanto, devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais livres, de forma que as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) estão constantemente presentes nas células eucarióticas. Esta revisão aborda os aspectos químicos da formação de EROs, os principais sítios de produção no metabolismo humano, os seus efeitos fisiológicos como mensageiros secundários na transdução de sinais e as defesas antioxidantes do organismo humano. O rompimento do equilíbrio entre a geração de EROs e as defesas antioxidantes resulta no estresse oxidativo, o qual está associado a algumas condições patológicas.

**UNITERMOS:** Espécies Reativas de Oxigênio; Efeitos Fisiológicos; Defesa Antioxidante; Estresse Oxidativo.

### INTRODUÇÃO

A existência de espécies químicas na forma de radicais livres foi primeiramente descrita no ano de 1900, quando a decomposição de hexa-feniletano em 2 radicais tri-fenilmetil foi demonstrada. Entretanto, reações envolvendo radicais livres no meio biológico foram consideradas de importância após 1940, com a introdução de técnicas que permitiram a detecção de radicais livres e os estudos da cinética das reações envolvendo espécies químicas de meia-vida curta. Cita-se, como exemplo, a Ressonância de Spin de Elétron (ESR) e a Radiólise de Pulso (BERGENDI et al., 1999).

As espécies químicas na forma de radicais livres centradas no oxigênio são de grande interesse na área biológica porque a partir delas podem ser geradas espécies reativas, envolvendo outros átomos. A evolução do conhecimento sobre os radicais livres de oxigênio no meio biológico foi gradativa, iniciando-se com a identificação

de enzimas cujos substratos são radicais livres (McCORD; FRIDOVICH, 1969) e progredindo para: a identificação de vias metabólicas geradoras de tais espécies (TURRENS; BOVERIS, 1980), a detecção de efeitos celulares e teciduais deletérios quando os radicais livres alcançam concentrações elevadas no meio fisiológico (FREEMAN; CRAPO, 1982), a associação do envolvimento de radicais livres com algumas condições patológicas (SIES, 1985) e a participação de espécies reativas (do tipo radicais livres ou deles derivadas) em vias de sinalização celular (HADDAD, 2002 a).

Existem várias definições para o termo “Radical Livre”. Muitos autores adotam uma definição abrangente e definem radical livre como “espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; DREHER; JUNOD, 1996; JANSEN, 2003). Esta definição engloba o átomo de hidrogênio (que possui um elétron desemparelhado), a maioria dos íons de metais de transição e o oxigênio molecular.

<sup>1</sup> Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG; doutoranda em Bioquímica Agrícola pelo Programa de Pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFV.

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

<sup>3</sup> Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

<sup>4</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV)..

<sup>5</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Received: 03/11/04

Accept: 25/01/05

A terminologia Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) inclui as espécies radicais livres e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade. Por esta razão, esse termo tem sido mais utilizado.

A geração de radicais livres ocorre em animais e plantas. A conversão de moléculas primárias a radicais livres requer energia de ativação relativamente alta; entretanto menor energia é requerida para decomposições subsequentes (BERGENDI et al., 1999).

O conhecimento dos mecanismos de formação e de regulação dos níveis das Espécies Reativas de Oxigênio *in vivo* são de importância para a compreensão de eventos celulares relacionados ao controle da sobrevivência, da morte e da proliferação celular e possibilita a geração de outros conhecimentos que permitam interferir na modulação de tais processos, para se alcançar efeitos desejáveis em sistemas biológicos animais e vegetais.

O objetivo desta revisão é abordar os aspectos mais relevantes sobre a geração das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em mamíferos, especialmente seres humanos, incluindo os sítios metabólicos de formação de EROs, seus efeitos em níveis fisiológicos e supra-fisiológicos e os principais mecanismos de defesa antioxidante do organismo.

### A reatividade do oxigênio molecular

Segundo a Teoria do Orbital Molecular, a molécula do oxigênio diatômico ( $O_2$  = oxigênio molecular ou tripleto), em seu estado fundamental, possui dois elétrons desemparelhados no orbital antiligante  $\pi^*$  (Figura 1a).

Nota-se que os dois elétrons apresentam *spins* paralelos e este fato restringe a reatividade da molécula, porque quando a mesma tenta oxidar outro átomo ou molécula, os elétrons que serão aceitos pelo oxigênio devem também ter *spins* paralelos para permanecerem nos orbitais vazios. Entretanto, esta condição é difícil de ser encontrada, porque a maioria das moléculas são não-radicaais ligados covalentemente e os dois elétrons que formam uma ligação covalente têm *spins* opostos, ocupando o mesmo orbital molecular. Assim, a reatividade do oxigênio com biomoléculas é restringida pelo spin (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Entretanto, é possível eliminar a restrição de spin da molécula de oxigênio, movendo um dos elétrons desemparelhados, o qual sofre uma inversão de spin e assim, os dois elétrons passam a emparelhar-se (Figura 1b). Isto requer energia e forma oxigênio simpleto, o qual não é designado de radical (por não possuir elétron desemparelhado), mas é uma forma excitada do oxigênio molecular. Há duas formas de oxigênio simpleto: uma com os dois elétrons em orbitais diferentes (Figura 1d) e outra, na qual os elétrons ocupam o mesmo orbital (Figura 1b). A primeira forma é considerada muito instável e antes de reagir com outras moléculas ela se converte no estado  $^1\Delta_g$  (Figura 1b), o qual é mais estável (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

A excitação do  $O_2$  ao estado simpleto pode ocorrer quando pigmentos absorvem fótons, entram em um estado de excitação eletrônica e transferem energia para o  $O_2$ , resultando nas formas excitadas. Como exemplo de sistemas pigmentados expostos à luz, cita-se as lentes oculares no processo da visão e os cloroplastos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

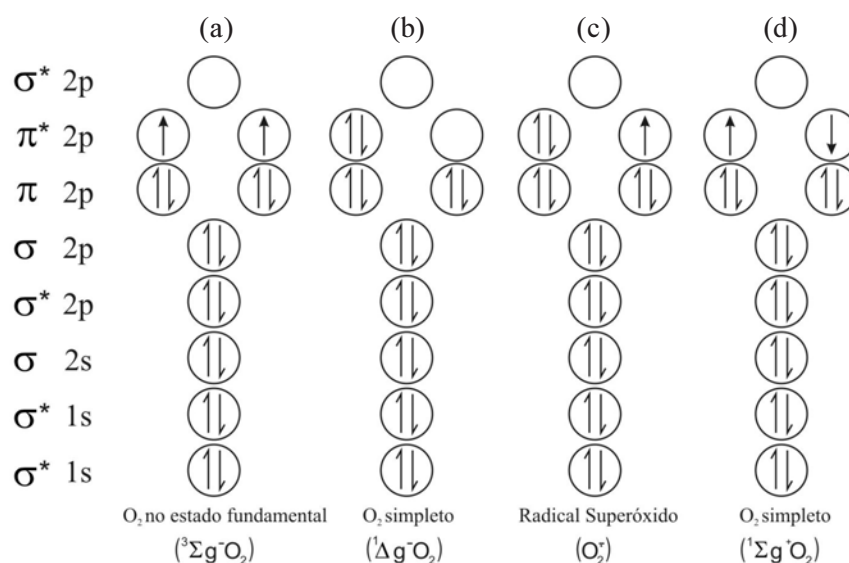


Figura 1. Estados do  $O_2$  segundo a Teoria do Orbital Molecular. Adaptado de Halliwell; Gutteridge, (1990).

Outras formas reativas do oxigênio de importância biológica podem ser formadas por reduções parciais do oxigênio, dando origem às espécies reativas: radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $\bullet OH$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

### Principais Espécies Reativas de Oxigênio geradas no organismo humano

Todas as formas de vida aeróbica estão constantemente sujeitas ao efeito oxidante dos metabólitos reativos de oxigênio, uma vez que estas espécies são produzidas durante o metabolismo aeróbico (WARNER, 1994). As Espécies Reativas de Oxigênio, formadas *in vivo*,

apresentam diferenças no potencial de reatividade e tempo de meia-vida (Tabela 1).

Quanto ao potencial de reatividade das EROs no meio biológico, o radical hidroxil é o mais reativo e em teoria, pode oxidar qualquer molécula biológica. Assim, é provável que o radical reaja nas proximidades dos sítios onde foi gerado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). O peróxido de hidrogênio, mais estável que o radical hidroxil, pode permear membranas e esta propriedade possibilita a ocorrência de reações com alvos biológicos em compartimentos distantes do seu local de formação (HANCOCK; DESIKAN; NEIL, 2001). O oxigênio simpleto pode reagir com lipídios de membrana, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos e tióis (RYTER; TYRREL, 1998).

**Tabela 1.** Caracterização das principais Espécies Reativas de Oxigênio formadas *in vivo*

Intermediário	Comentário	Meia-vida	Sítios de formação
Radical superóxido	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 1 elétron.	Decomposição enzimática na velocidade aproximada de $5 \times 10^5 M^{-1}sec^{-1}$ em pH 7,0.	Reações de autooxidação envolvendo flavoproteínas e ciclos redox.
Peróxido de hidrogênio	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 2 elétrons.	Decomposição enzimática.	Vias catalisadas por oxidases, e pela superóxido dismutase.
Radical hidroxil	Formado a partir da redução do oxigênio molecular, por 3 elétrons nas reações de Fenton e Haber-Weiss, catalisada por metais.	$10^{-9}$ segundos	Locais adjacentes à formação de ânion superóxido/peróxido de hidrogênio na presença de metais, principalmente ferro; produto de reação do óxido nítrico com o radical superóxido.
Radical alcóxil	Radical orgânico centrado no oxigênio.	$10^{-6}$ segundos	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana.
Radical peróxil	Formado a partir de hidroperóxidos orgânicos	7 segundos	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana.
Oxigênio molecular Simpleto. ( $^1\Delta_g O_2$ )	Primeiro estado excitado do Oxigênio Molecular com nível de energia de 22 kcal/mol acima do estado fundamental ou oxigênio tripleto ( $^3O_2$ ).	$10^{-5}$ segundos	Sem sítios metabólicos definidos.

Fonte: Bergendi et al., (1999); Sies, (1985); Halliwell; Gutteridge, (1990).

Ressalta-se que as EROs podem se combinar com outros átomos e formar outras espécies reativas. Merece comentário o óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) que é uma espécie radical centrada no átomo de nitrogênio, apresenta meia-vida de

1 a 10 segundos e desempenha importantes funções no organismo humano. O óxido nítrico pode reagir com as EROs, principalmente radical superóxido, gerando peroxinitrito ( $OONO\bullet$ ) e outros produtos, que são muito

tóxicos por causar nitração de proteínas e induzir a peroxidação lipídica (CARRERAS et al., 1994; GIASSON et al., 2002).

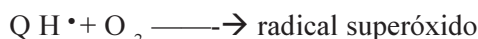
**Sítios fisiológicos de formação das Espécies Reativas de Oxigênio**

*Radical superóxido*

O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), a primeira das espécies formadas pela redução do oxigênio por um único elétron, pode agir como oxidante ou como redutor (FRIDOVICH, 1989), dando origem a outras espécies reativas. Há várias vias metabólicas onde se forma o radical superóxido.

*Cadeia respiratória na mitocôndria*

O radical superóxido é formado em todas as



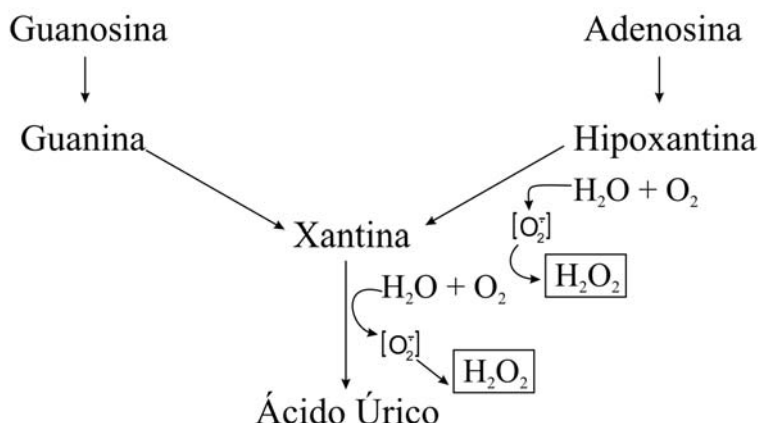
$e^-$  = elétron; Q= Coenzima Q;  $QH^{\bullet}$  = forma semiquinona da Coenzima;  $QH_2$  = Coenzima Q reduzida

*Via da xantina oxidase.*

Várias enzimas catalisam a redução de  $O_2$  por um elétron, para formar . Uma delas é a xantina oxidase, uma flavoproteína que catalisa a conversão de hipoxantina em

células aeróbicas (FRIDOVICH, 1995). Do total de oxigênio consumido na cadeia respiratória, 95 a 98% é utilizado como acceptor final de elétrons pelas células animais, sendo totalmente reduzido (por quatro elétrons) com a formação de água, através de etapas subseqüentes de reduções parciais por um elétron, que ocorrem na cadeia respiratória. Entretanto, cerca de 2 a 5% do oxigênio é gerado como um intermediário reduzido por um elétron, formando o radical superóxido - (TURRENS; BOVERIS, 1980). A redução completa da ubiquinona ou Coenzima Q requer dois elétrons e dois prótons e ocorre em duas etapas por meio de um intermediário radicalar semiquinona (NELSON; COX, 2000), que pode ser oxidado pelo oxigênio molecular, dando origem ao radical superóxido. Afirma-se que a formação de ocorre em decorrência do “vazamento” de elétrons na cadeia respiratória, ao nível de Coenzima Q, entre os complexos I e III (CARRERAS et al., 2004), conforme o esquema seguinte:

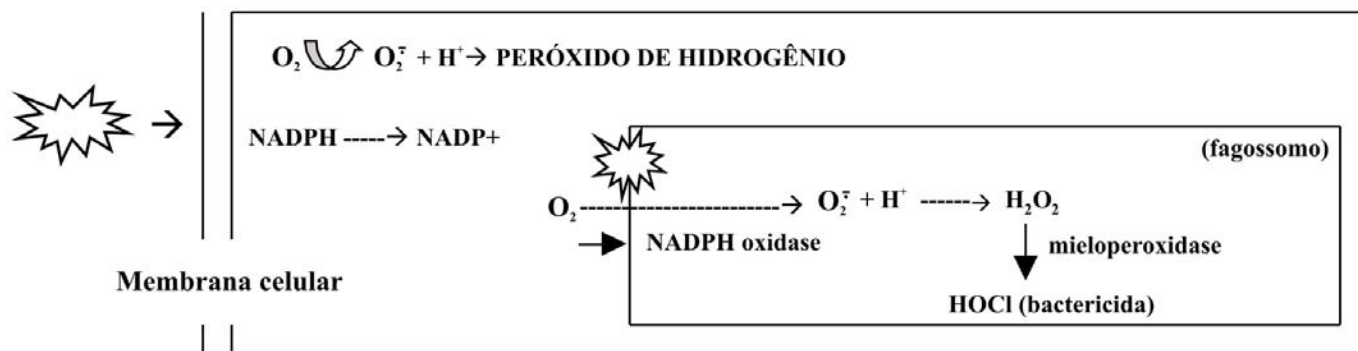
xantina, na via de catabolismo de purinas para formação de ácido úrico. No mecanismo da reação há formação de radical superóxido, que participa como intermediário nas reações que formam peróxido de hidrogênio (MURRAY et al., 1996), conforme esquema a seguir:



*Via da NADPH oxidase em células fagocíticas*

Durante a explosão respiratória ou “burst” das células fagocíticas (neutrófilos, monócitos, macrófagos e

eosinófilos) há formação do radical superóxido, na via metabólica catalisada por NADPH oxidase, dando origem ao ácido hipocloroso que apresenta função bactericida, para alguns tipos de bactérias (Figura 2).



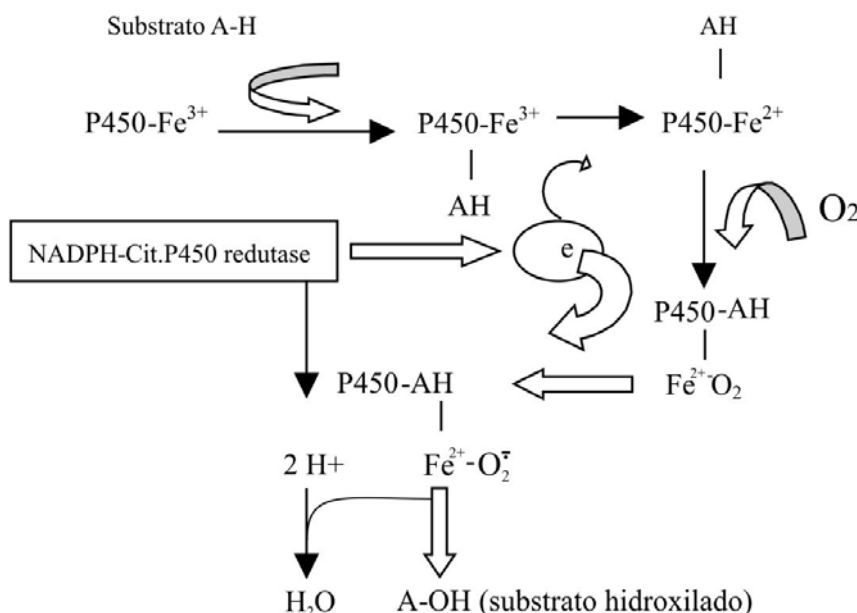
**Figura 2.** Formação de radical superóxido em neutrófilos catalisada por NADPH oxidase. Adaptado de Sies, (1985).

*Via da síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso*

Na via metabólica de síntese de prostaglandinas há formação de e outras EROs. Há conversão de araquidonato em prostaglandinas e o processo inicia com a formação de Prostaglandina- $H_2$  ( $PGH_2$ ), a qual é precursora de outras prostaglandinas e de tromboxanos. No mecanismo da reação há adição de oxigênio molecular, com etapas de redução parcial por um elétron e formação do radical superóxido (NELSON; COX, 2000).

*Sistema NADPH citocromo P-450 redutase microsomal*

O sistema microsomal das monoxigenases ou oxidases de função mista, presente principalmente no retículo endoplasmático liso, está envolvido no metabolismo de xenobióticos. O sistema utiliza o oxigênio para hidroxilar as moléculas de xenobióticos, aumentando sua polaridade para facilitar posteriores reações de conjugação, o que possibilita a excreção pelas vias biliar ou urinária (MURRAY *et al.*, 1996). No mecanismo da reação de hidroxilação o radical superóxido é um intermediário, formando um complexo com o átomo de ferro do citocromo (Figura 3).



**Figura 3.** Via metabólica de biotransformação de xenobióticos pelo sistema NADPH Citocromo P450 redutase. A-H : xenobiótico; P450 –Fe<sup>3+</sup> : enzima; e : elétrons; A-OH : xenobiótico hidroxilado. Adaptado de Murray *et al.*, (1996).

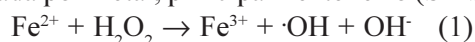


### Peróxido de hidrogênio

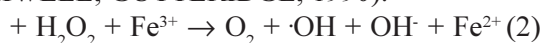
Dois radicais superóxido formam peróxido de hidrogênio, por conversão espontânea e enzimática. Em pH fisiológico, a baixa concentração de prótons reduz a taxa de reação espontânea e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado, *in vivo*, é o produto da reação enzimática para eliminação do radical superóxido pela ação da superóxido dismutase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Assim, as vias citadas anteriormente como geradoras de formam subsequente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, o peroxissomo é um compartimento celular no qual há geração de grande quantidade de peróxido de hidrogênio, através da atuação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e na oxidação de ácidos graxos. As flavoproteínas desidrogenases, as quais introduzem duplas ligações, são reduzidas e imediatamente oxidadas pelo O<sub>2</sub>, produzindo peróxido de hidrogênio (NELSON; COX, 2000).

### Radical hidroxil

A reação de Fenton (1) tem sido proposta como a principal via de geração do radical hidroxil, *in vivo*, através da decomposição do peróxido de hidrogênio catalisada por metal, principalmente ferro (SIES, 1985).



As observações de que a formação de radical hidroxil em sistemas geradores de , é inibida pela adição de superóxido dismutase mostraram que o radical superóxido está envolvido na produção de radical hidroxil. Assim, propôs-se a reação de Waber Weiss (Reação 2), que inclui a redução do Fe<sup>3+</sup> pelo radical superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).



### Efeitos fisiológicos das Espécies Reativas de Oxigênio

As Espécies Reativas de Oxigênio podem ser consideradas moléculas com funções de mensageiros secundários. Serão abordados dois aspectos básicos das possíveis funções fisiológicas das EROs: 1) a regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox e 2) as alterações da homeostase celular, através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas.

Por serem espécies químicas reativas, o meio biológico utiliza as EROs ou os produtos de suas reações em vias de sinalização. A regulação da expressão gênica baseada na oxidação-redução parece representar um mecanismo regulatório fundamental da célula, provavelmente por modulação da atividade de alguns

fatores de transcrição (HADDAD, 2002a). Intermediários reativos de oxigênio (radical superóxido, peróxido de hidrogênio) e metabólitos oxidados, em níveis fisiológicos (os quais a célula pode tolerar) mediam a alteração da expressão de genes (HADDAD, 2002b).

As EROs apresentam potencial para serem consideradas moléculas de sinalização, uma vez que preenchem os seguintes critérios (HANCOCK; DESIKAN; NEILL, 2001):

- i) são produzidas por células quando estimuladas;
- ii) têm ação na célula onde é produzida ou em células próximas;
- iii) quando removidas do meio, reverterem o sinal.

A indução da expressão gênica pelo Fator Nuclear K-B (NF-kB), envolvendo sinalização redox, é uma das mais exploradas e ilustra alguns possíveis mecanismos moleculares que podem ocorrer em vias de sinalização redox-sensíveis. O Fator Nuclear k-B (NF-kB) é um fator de transcrição que pode ser ativado por oxidantes e sua atividade induzida é inibida por antioxidantes. No estado inativo o NF-kB encontra-se no citosol complexado a uma proteína inibidora (IkB). Sob condições de estímulo, há a dissociação do complexo e a degradação da proteína IkB. A proteína NF-kB transloca-se para o núcleo, guiada por uma seqüência sinal (a qual é exposta após a dissociação do complexo) e se liga aos sítios nas regiões do promotor dos genes alvo, ativando a transcrição de genes, cujos produtos atuam como mediadores pró-inflamatórios (HADDAD, 2002b). Sugere-se que algumas quinases sejam sensíveis ao estado redox celular, tornando-se ativas quando oxidadas, o que culmina na fosforilação de IkB e dissociação do complexo, com sua posterior ubiquitinação e degradação (HADDAD, 2002a; KAMATA; HIRATA, 1999).

Presume-se que após a dissociação de NF-kB deve existir uma via regulatória redox, mediada por redutores celulares, tais como glutatona reduzida e tioredoxina, pois a ligação do Fator de Transcrição na seqüência de DNA dos genes alvo só ocorre se NF-kB estiver reduzida (HADDAD, 2002a). De fato, a estrutura da subunidade p50 de NF-kB que estabelece a ligação com o DNA contém uma cisteína 62, que pode ser um alvo de regulação redox, por um doador de próton como glutatona reduzida ou tioredoxina (HADDAD, 2002b).

As evidências anteriores suportam a sugestão de que o estado redox basal, tendendo à oxidação, é um pré-requisito para ativação de vias de transdução que regulam a atividade de genes dependentes de NF-kB.

Outros fatores de transcrição da família AP-1, que são relacionados aos produtos de oncogenes (*c-fos* e *c-jun*), também podem ser regulados por alterações ao

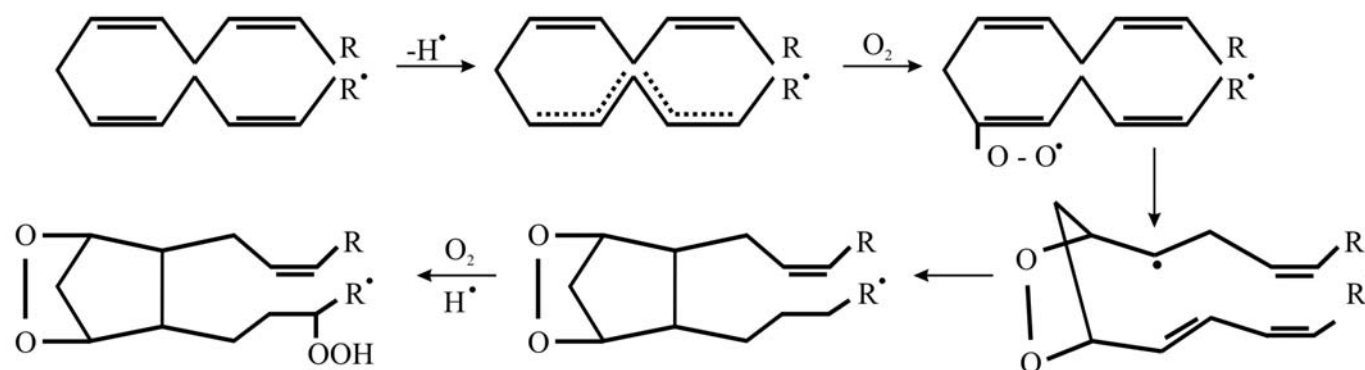
nível de fosforilações e do estado redox (ABATE et al., 1990). Os genes *c-fos* e *c-jun* são induzíveis por estímulos extracelulares e são reguladores de transcrição de proteínas envolvidas em processos de proliferação e transformação celular (SUN; OBERLEY, 1996).

O estado redox celular pode modular proteínas quinases (PKC) por vários mecanismos, incluindo regulação redox direta, fosforilação de tirosina e oxidação de lipídio. Há comunicação entre os sistemas de sinalização celular e o estado redox da célula. Parece que não só as vias de sinalização estão sujeitas à regulação redox, mas também os sistemas de sinalização regulam o estado redox celular (KAMATA; HIRATA, 1999).

Metabólitos das reações de EROs são moléculas

candidatas a exercerem possíveis ações fisiológicas. Recentemente, uma complexa família de compostos, isômeros das prostraglandinas, foram descobertos e denominados de isoprostanos - iP's (ADIYAMAN et al., 1996). Há várias possíveis estruturas de isoprostanos, derivados dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas (ROKACH et al., 2004).

Os isoprostanos (iP's) são produzidos *in vivo* por mecanismo envolvendo radical livre iniciado por EROs, independente da via da ciclooxigenase, a qual gera prostraglandinas (Figura 4). São formados através de peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios, sendo subsequentemente liberados na forma livre, por ação de fosfolipases (ROKACH et al., 2004).



Fonte: Roberts II; Fessel, (2004).

**Figura 4.** Mecanismo mediado por radical livre (não-enzimático) proposto para a formação de isoprostanos.

Concentrações nanomolares de isoprostanos foram detectadas no soro e sangue de indivíduos normais e o aumento para várias ordens de magnitude foi observado em algumas condições patológicas (PRATICÓ et al., 1998; CRACOWSKI; DURAND; BESSARD, 2002). Observou-se que níveis de F2-isoprostanos em fluidos biológicos, em condições normais, excede os níveis de prostraglandinas (TABER et al., 2004) e que há eliminação urinária de isoprostanos (MOORE, 2004). Os isoprostanos apresentam ações fisiológicas em concentrações nanomolares (JANSEN, 2004) e farmacológicas em níveis micromolares (JANSEN et al., 2000). Sugere-se que os isoprostanos são mediadores na regulação de tônus vascular devido sua ação inibitória ou excitatória, já que os mesmos podem se ligar a receptores de prostraglandinas e tromboxanos (JANSEN, 2004). A formação elevada de isoprostanos é prejudicial ao organismo pois reações envolvendo rearranjo da molécula de iP's formam cetoaldeídos muito reativos, os

quais podem formar complexos com proteínas e contribuir para injúrias celulares, que culminam em condições patológicas (DAVIES; AMARNATH; ROBERTS, 2004; CRACOWSKI, 2004).

As respostas celulares secundárias à ação dos isoprostanos estão sob investigação e os mecanismos moleculares presentes em células endoteliais são os mais estudados.

Como existem várias classes de iP's, alguns induzem respostas vasodilatadoras e outros vasoconstritoras. Os sinais de transdução para contração vascular podem envolver ativação de fosfolipase C, proteína quinase C, canais de cálcio e conseqüente síntese de DNA e proliferação celular. A fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) e o bloqueio de sua defosforilação por fosfatase têm sido propostos para explicar o mecanismo molecular da ação vasoconstritora de iP's (HABIB; BADR, 2004).

## Mecanismos de defesa antioxidante do organismo

O surgimento do oxigênio na atmosfera, ao longo dos períodos evolucionários, trouxe como consequência a sua toxicidade, já que seus metabólitos são muito reativos. Há afirmações que em consequência disso, alguns organismos morreram, alguns escolheram processos de obtenção de energia diferentes (anaerobiose) e outros, considerados oportunistas, utilizaram o oxigênio para extrair mais energia dos nutrientes, em decorrência de seu alto potencial eletroquímico e tiveram que se adaptar para se defenderem dos efeitos deletérios do oxigênio (FRIDOVICH, 1989).

A formação endógena de EROs é uma consequência indiscutível do metabolismo aeróbico (MICHIELS et al., 1994).

Em concentrações fisiológicas as EROs têm funções biológicas definidas, atuando como mensageiros de sinalização. Entretanto, concentrações supra-fisiológicas devem ser evitadas pelo organismo, considerando que sua reatividade traz consequências celulares deletérias, causando a oxidação de biomoléculas tais como proteínas, lipídios, carboidratos, DNA e o rompimento da homeostase celular (SIES, 1985).

Para se defender da toxicidade das EROs, o organismo apresenta mecanismos de defesa, em três níveis distintos (SIES, 1993):

1. Prevenção da formação de EROs;
2. Eliminação de EROs formadas;
3. Reparo de moléculas modificadas por EROs.

### *Prevenção da formação de Espécies Reativas de Oxigênio*

A prevenção da formação de Espécies Reativas de Oxigênio inclui mecanismos antioxidantes, em sentido mais amplo. Como exemplo, cita-se: a restrição de spin do oxigênio que diminui a sua reatividade com biomoléculas, o transporte de oxigênio na forma ligada e não livre, a quelação de metais durante transporte e armazenamento, evitando a ocorrência da reação de Fenton, a eficiência da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria que mantém a formação de EROs em nível controlado e a organização estrutural do DNA em cromatina (SIES, 1993).

### *Eliminação de Espécies Reativas de Oxigênio formadas*

A eliminação, também denominada de interceptação (SIES, 1993), é feita através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos.

**Mecanismo antioxidante enzimático** - As enzimas envolvidas na proteção antioxidante primária do organismo humano constituem uma proteção intrínseca (Tabela 2) e incluem superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (Se-Gpx), glutatona redutase (Gr), glutatona S-transferases (GST), Catalase (MICHIELS et al., 1994), tiorredoxina redutase (Txr) (NORDBERG; ARNÉR, 2001) e as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutores nos compartimentos citosólico e mitocondrial: glicose 6-fosfato desidrogenase, 6- fosfogluconolactona (CALBERG; MANNERVIK, 1975) e transidrogenase (KUROSAWA et al., 1990).

Através da ação das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, glutatona redutase, glutatona peroxidase e catalase, o organismo mantém a concentração de EROs dentro de limites fisiológicos (Tabela 2) e através do Sistema Tiorredoxina regula o nível de alvos moleculares oxidados, os quais apresentam comunicação estreita com os “ajustes finos” relacionados à expressão gênica.

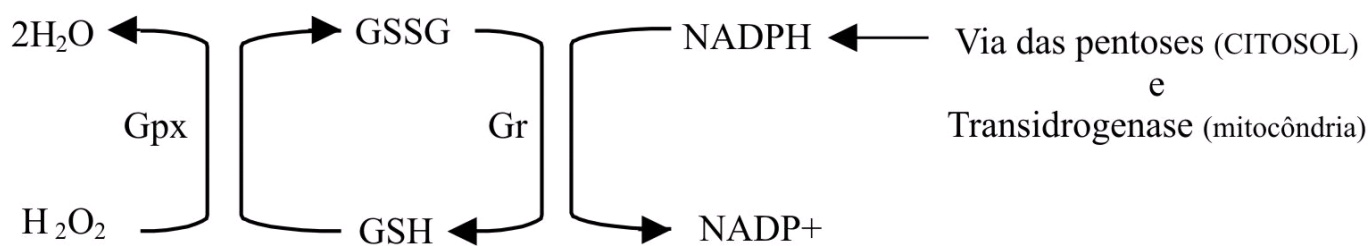
A glutatona reduzida (GSH) é um tripeptídeo, formado por glicina, ácido glutâmico e cisteína e constitui o tiol redutor mais abundante no meio intracelular (SIES, 1985). A manutenção de níveis adequados de GSH é feita às custas da atividade da glutatona redutase, a qual utiliza equivalentes redutores do NADPH para manter glutatona na forma reduzida, como substrato para glutatona peroxidase (Figura 5). Assim, a atuação eficiente de Se-Gpx exige um sistema enzimático seqüencial que envolve a glutatona redutase e as enzimas que mantêm níveis de NADPH, nos compartimentos citosólico e mitocondrial (REMACLE et al, 1992).

O sistema glutatona peroxidase é muito eficiente na proteção antioxidante contra o peróxido de hidrogênio, porque o valor de Km da enzima para este substrato é de 1µM, o que auxilia na manutenção de níveis baixíssimos do produto da reação catalisada por superóxido dismutase (FLOHÉ; BRAND, 1969).



**Tabela 2.** Principais enzimas antioxidantes que catalisam a eliminação de EROs

Enzima	Ação	Comentários
Superóxido dismutase –SOD (Superóxido: superóxido óxido - redutase - EC.1.15.1.1)	$+ + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Descoberta em 1969 (McCord; FRIDOVICH, 1969). Presente no citosol, na mitocôndria e extracelular (MARKLUND, 1990).
Glutationa peroxidase - Se-Gpx: (Glutationa: peróxido de hidrogênio óxido - redutase - EC.1.11.1.9)	$ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + H_2O + GSSG$ ROOH = peróxido; GSH = Glutationa reduzida; GSSH = Glutationa oxidada	Foram descritas quatro diferentes enzimas Gpx em mamíferos: Gpx1, Gpx2, Gpx3 e Gpx4 (URSINI et al., 1995). Contêm selênio e atuam no citosol e na mitocôndria. Juntamente com GSH e Glutationa reduzida, constitui o denominado Sistema Gpx.
Glutationa S-transferases (GSTs):	Transferases que catalisam reações de conjugação entre glutationa (GSH) e moléculas oxidadas.	São peroxidases, independentes de selênio, utilizadas para remoção de hidroperóxidos orgânicos (TAN et al., 1987).
Catalase – (Peróxido de hidrogênio: peróxido de hidrogênio óxido- redutase – EC 1.11.1.6)	$2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$	A principal função da enzima é eliminar peróxido formado no peroxissoma, diminuindo o risco da formação de radical hidroxil, via Reação de Fenton (NORDBERG; ARNÉR, 2001). O Km da enzima para o peróxido de hidrogênio é de 1,1 M (OGURA, 1955).



Gr = glutaciona redutase  
Gpx = glutaciona peroxidase

GSH = glutaciona reduzida  
GSSG = glutaciona oxidada

**Figura 5.** Vias enzimáticas de manutenção da glutaciona na forma reduzida. Adaptado de Remacle et al., (1992).

No sistema tiorredoxina incluem-se as reações catalisadas pelas enzimas oxirredutases: tiorredoxinas e tiorredoxina redutase (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

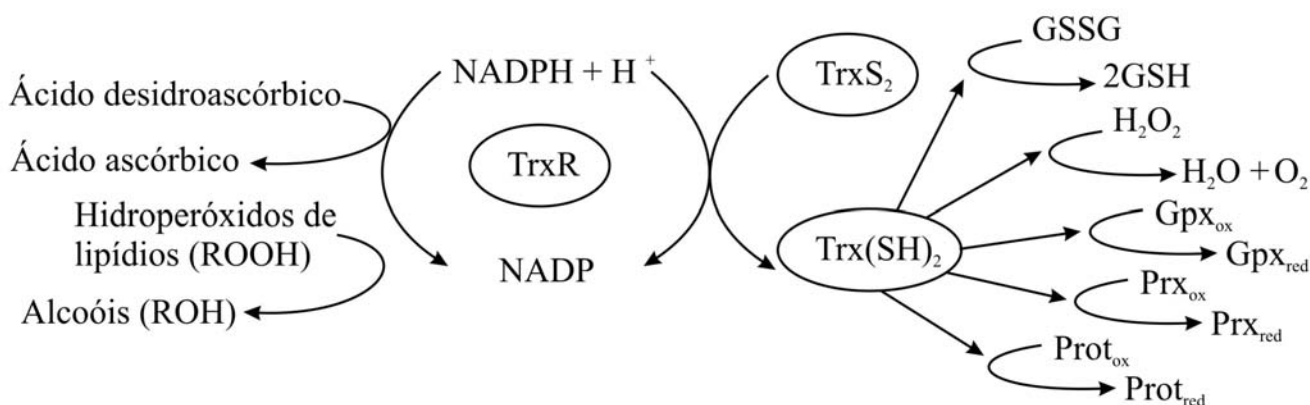
As tiorredoxinas (Trx) são enzimas recentemente identificadas em mamíferos, as quais catalisam reduções, utilizando vários substratos (CHAE; KANG; RHEE,

1999). Em humanos, foram identificadas três distintas variantes de Trx, codificadas por genes separados. As Trxs contêm uma seqüência conservada (Cys-Gly-Pro-Cys) que é o sítio ativo da enzima, sendo essencial para a função de uma potente proteína oxirredutase dissulfeto (HOLMGREN, 1989). As tiorredoxinas doam equivalentes redutores para proteínas, dissulfetos de GSH ou GSSG, peróxido de hidrogênio, tornam-se oxidadas e são reduzidas pela tiorredoxina redutase (TrxR) (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A tiorredoxina redutase utiliza NADPH para reduzir pontes de dissulfeto da tiorredoxina, de outras proteínas e de compostos de baixo peso molecular. A Tiorredoxina redutase (TrxR) contém selênio na forma de selenocisteína, o que é essencial para a sua atividade enzimática (STADTMAN, 1996). Uma característica da enzima de mamíferos é sua ampla especificidade por

substratos, o que parece atribuir ao sistema tiorredoxina a função primordial na manutenção do estado redox da célula, podendo atuar em sistemas de regulação da expressão de genes redox-sensíveis, através da ativação de fatores de transcrição (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Sugere-se que a TrxR possa funcionar como um sensor redox celular (SUN *et al.*, 1999).

Há vários substratos que podem ser reduzidos por TrxR: ácido desidroascórbico, hidroperóxidos de lipídios, sítio ativo da glutathione peroxidase, peróxido de hidrogênio, glutathione oxidada (GSSG), peroxirredoxinas (Prx) e outras proteínas oxidadas (Protox) (Figura 6). Em razão do elevado Km da TrxR para o peróxido de hidrogênio (2,5 mM), acredita-se que o papel da enzima seja importante na proteção celular quando os níveis de substrato estão elevados (ZHONG; HOLMGREN, 2000).



**Figura 6.** Substratos da tiorredoxina redutase (TrxR) e das tiorredoxinas (Trx). Ambas as enzimas TrxR e TrxS<sub>2</sub> utilizam equivalentes redutores do NADPH para reduzir vários substratos oxidados, incluindo compostos de baixo peso molecular e proteínas Trx (SH)<sub>2</sub>. Adaptado de Nordberg; Arnér, (2001).

A expressão de Trx é induzida pelo estresse oxidativo, através dos Elementos de Resposta a Antioxidantes (ARE), presentes na região do promotor de Trx, o que resulta na redução de biomoléculas e funciona como uma defesa antioxidante adicional (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Glutarredoxinas (Grx) são tiorredoxinas que contêm um dissulfeto redox ativo e um sítio de ligação para GSH e juntamente com NADPH, glutathione redutase e glutathione formam o principal sistema oxirredutase de dissulfetos de proteínas (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

As enzimas antioxidantes apresentam cooperação sinérgica para manter a concentração de EROs dentro de limites fisiológicos. Catalase e SOD agem principalmente em regiões hidrofílicas, enquanto o sistema Gpx protege regiões hidrofóbicas, com especificidade para peróxidos de lipídios (MICHIELS *et al.*, 1994). Entretanto,

ainda é objeto de investigação a proteção tecido-específica de cada enzima, isoladamente. O sistema tiorredoxina, protege amplamente os componentes celulares e auxilia as demais enzimas para ajustar o estado redox celular (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

**Mecanismo antioxidante não enzimático** - A proteção antioxidante por mecanismo não enzimático é feita por moléculas que protegem alvos biológicos da oxidação, por apresentarem uma das três propriedades: supressão da formação de radical livre (quelação de metais ou inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação de radicais livres ou desativação, formando um produto estável e participação em processos de reparo (BOURNE; RICE-EVANS, 1999). Há uma variedade de moléculas com potencial para apresentar uma destas características, incluindo algumas do próprio organismo e outras exógenas, sintéticas ou naturais (SIES, 1993).

Antioxidantes exógenos, componentes da dieta, constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo, incluindo moléculas lipofílicas ou hidrofílicas, que protegem compartimentos apolares e polares do meio biológico, respectivamente. Como exemplo, cita-se: tocoferol, ascorbato, carotenóides e compostos fenólicos encontrados em alimentos de origem animal e vegetal, os quais constituem um grupo heterogêneo de antioxidantes não-nutrientes (STIPANUK, 2000).

### Reparo

O mecanismo de reparo de danos causados por EROs, mais estabelecido, até o momento, é o Sistema de Reparo do DNA, embora as ações de proteases e fosfolipases possam ser consideradas formas de reparo (VAN KUIJK et al., 1987; BOTA et al., 2002).

Se os mecanismos antioxidantes não conseguem impedir os danos ao DNA, ocorrem injúrias oxidativas, que incluem a modificação de bases, de açúcares e a formação de ligações cruzadas entre fitas duplas e simples. Entretanto, as modificações mais compreendidas são as que ocorrem nas bases, tendo sido identificados aproximadamente 20 produtos oxidados (DIZDAROGLU, 1991).

Três mecanismos básicos foram descritos para reparar danos oxidativos do DNA: Reparo de Excisão de Bases - REB, Reparo de Excisão de Nucleotídeo - REN e Reparo de Erro de Pareamento - REP (LUNEC et al., 2002).

## Efeitos deletérios das Espécies Reativas de Oxigênio

### Estresse oxidativo

A condição fisiológica da célula exige equilíbrio entre as condições pro-oxidante e antioxidante. O rompimento do estado estacionário em favor da condição pro-oxidante favorece injúrias celulares, sendo a condição denominada de estresse oxidativo, tendo como conseqüências danos às biomoléculas como o DNA, os lipídios, as proteínas e os carboidratos (SIES, 1993).

As proteínas podem ser oxidadas através de mecanismo catalisado por metais. O Ferro é considerado de importância em tais reações, porque pode participar de ciclo redox através de reação com oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio, gerando EROs, as quais oxidam aminoácidos alterando a função das proteínas (LEVINE et al., 1990). Metionina, histidina e triptofano são alvos que podem ser oxidados por oxigênio simpleto (SIES, 1985). Entretanto, considerando o número de 20

aminoácidos presentes em proteínas e as possibilidades de regiões de oxidação na molécula, pode existir uma variedade de produtos oxidados (EVANS; LYRAS; HALLIWELL et al., 1999).

Outros alvos susceptíveis de oxidação por EROs são os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e organelares. As reações de peroxidação de lipídios são as mais exploradas no campo da biologia. Os mecanismos propostos para a reação de lipoperoxidação sugerem a participação do radical hidroxil, oxigênio molecular e ferro. A reação inicia-se por abstração de um hidrogênio do ácido graxo, contendo dupla ligação, com formação de radical lipídico (L $\cdot$ ), o qual reage com o oxigênio molecular. Em seguida, ocorre a reação em cadeia e a formação de produtos de quebra, como por exemplo, aldeídos (SIES, 1985). O malondialdeído é utilizado como marcador bioquímico da peroxidação de lipídios em sistemas *in vivo* e *in vitro*.

Uma característica das reações de peroxidação lipídica é a ocorrência de reações em cadeia as quais, se não terminadas, ocorrem continuamente, destroem fases lipídicas, alterando especialmente as membranas (SIES, 1985) e modificam partículas de lipoproteínas (HANDELMAN, 1999). Além das modificações citadas, os produtos de quebra da peroxidação lipídica são considerados tóxicos às células e podem alterar proteínas, criando regiões de epitopos, que desencadeiam respostas imunológicas (WITZUM, 1994).

Os danos no DNA causados por EROs envolvem clivagem da ligação fosfodiéster, alteração de ribose e oxidação de bases. Muitas observações sobre os mecanismos de tais injúrias foram feitas a partir de modelos que utilizaram irradiação gama para provocar danos ao DNA (SIES, 1985). O acúmulo de lesões no DNA tem conseqüências para a célula, relacionadas à mutagênese e carcinogênese (MOREL et al., 2001). Afirma-se que carcinogênese e envelhecimento estão relacionados aos danos oxidativos do DNA (NIE et al., 2001).

O estresse oxidativo é considerado um evento celular importante em muitos processos patológicos, sendo a hipótese oxidativa uma das mais atraentes, na área da medicina, para explicar mecanismos moleculares de algumas doenças (SORG, 2004).

### A hipótese oxidativa de algumas doenças

“Hipótese oxidativa de doenças” é um termo que deve ser entendido como a ocorrência da condição oxidativa na célula durante o processo patológico e não exclusivamente a existência do estresse oxidativo como etiologia da doença.

A associação do estresse oxidativo em várias condições patológicas é uma realidade. A questão é a compreensão se ele é a causa ou a consequência da perda da homeostase celular, apesar de existir ceticismo quanto a importância do estresse oxidativo na biologia e na medicina (SORG, 2004).

A presença do estresse oxidativo tem sido bem documentada nas seguintes condições patológicas: aterosclerose (KEANEY; VITA, 1995; ESTERBAUER *et al.*, 1992; WITZTUM; STEINBERG, 2001), doenças neurodegenerativas, incluindo Doença de Alzheimer (GIASSON *et al.*, 2002; BUTTERFIELD, 2004), Esclerose Amiotrófica Lateral (SORG, 2004), Mal de Parkinson (CUI *et al.*, 2004), câncer (LOO, 2003) e Síndrome de Down (JOVANOVIC; CLEMENTS; Mc LEOD, 1998).

Há evidências de que o estresse oxidativo esteja associado não apenas aos processos patológicos, mas também aos eventos fisiológicos relacionados à senescência. Uma das teorias do envelhecimento aponta que o estresse oxidativo decorrente do desacoplamento de reações de transporte de elétrons e da elevação dos níveis de metais causam aumento de EROs, oxidação de proteínas, elevação de proteínas inativas e consequente acúmulo destas, por deficiência dos sistemas de degradação proteica, levando à alteração da homeostase celular (LINTON; DAVIES; DEAN, 2001).

### Considerações finais

- A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) é uma condição fisiológica associada à vida aeróbica;

- O organismo humano apresenta mecanismos intrínsecos (endógenos) e extrínsecos (exógenos) para manter a concentração de EROs dentro de limites fisiológicos;
- Em baixas concentrações, as EROs funcionam como mediadores de sinalização em mecanismos de ajuste celular, relacionados à pressão de oxigênio dentro de compartimentos sub-celulares, proliferação, defesa e morte celular. EROs são considerados mensageiros secundários;
- Os mecanismos para controle de fatores de transcrição podem ocorrer via diminuição da ligação em regiões do promotor por alteração oxidativa do fator ou ativação dos fatores por regulação redox;
- O sistema tioredoxina controla o estado redox de tióis intracelular e está envolvido em mecanismos de comunicação entre citosol e núcleo para regular a expressão de genes específicos;
- As reações de EROs com moléculas biológicas e o nível de envolvimento de EROs com os mecanismos de regulação gênica não estão completamente estabelecidos;
- Em concentrações elevadas EROs provocam injúrias celulares, por meio de modificações em proteínas, lipídios, DNA e carboidratos, resultando na condição denominada de estresse oxidativo, a qual pode estar relacionada ao surgimento de condições patológicas no organismo;
- Há várias condições patológicas associadas ao estresse oxidativo e o conhecimento delas pode levar ao progresso nos âmbitos preventivo e terapêutico das doenças.

---

**ABSTRACT:** The oxygen is used as electrons final acceptor by all the aerobic organisms, because it allows a high energy production in respiration due to its high electrochemical potential. However, due to its electronic configuration, the oxygen may be partially reduced and it might result in the production of free radicals and so, the Reactive Oxygen Species (ROS) are constantly present in the eucaryotic cells. In this paper, we review the chemical aspects involved in the formation of ROS, their main cellular sites of production in human metabolism, its physiological effects as second messengers in cellular signaling systems, and the antioxidant defense mechanisms of the human organism. When the cellular steady state between ROS formation and antioxidant defenses is disrupted, oxidative stress arises, which may result in pathological consequences.

**UNITERMS:** Reactive Oxygen Species; Physiological Effects; Antioxidant Defense; Oxidative Stress.

---

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, C.; PATEL, L.; RAUSCHER, F.; CURRAN, T. Redox regulation of *fos* and *jun* DNA binding activity *in vitro*. *Science*, New York, v. 249, n. 7, p. 1157-1161, Sept. 1990.



ADIYAMAN, M.; LAWSON, J. A.; HWANG, S. W.; KHANAPURE, S. P.; FITZGERALD, G. A.; ROKACH, J. Total synthesis of a novel isoprostane IPF<sub>2c</sub>-I and its identification in biological fluids. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 37, n. 28, p. 4849-4852, July 1996.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, Elmsford, v. 65, n. 18/19, p. 1865-1874, Oct. 1999.

BOTA, D. A.; REMMEN, H. V.; DAVIES, K. J. A. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 532, n. 1/2, p. 103-106, 2002.

BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C. A. Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. IN: **Methods in Enzymology**, New York, v. 299 (Part A), p. 91-151, 1999.

BUTTERFIELD, D. A. Proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1000, n. 1/2, p. 1-7, Mar. 2004.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, n.14, p. 5475-5480, July 1975.

CARRERAS, M. C.; FRANCO, M. C.; PERALTA, J. G.; PODEROSO, J. J. Nitric oxide, complexo I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 25, n.1/2, p. 125-139, Feb. /Apr. 2004.

CARRERAS, M. C.; PARGAMENT, G. A.; CATZ, S. D.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during respiratory burst of human neutrophils. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 341, n. 1, p. 65, Mar. 1994.

CHAE, H.Z.; KANG, S. W.; RHEE, S. G. Isoformas de mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. **Methods in Enzymology**, New York, v. 300 (Part B), p. 219-226, 1999.

CRACOWSKI, J. Isoprostanes: an emerging role in vascular physiology and disease? **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 128, n. 1/2, p. 75-83, Mar. 2004.

CRACOWSKI, J. L.; DURAND, T.; BESSARD, G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. **Trends in Pharmacological Science**, Amsterdam, v. 23, n. 8, p. 360-366, Aug. 2002.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; VEM MURTHY, M. R. Role of oxidative stress in neuro-degeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. Oxford, v. 28, n. 5, p. 771-799, Aug. 2004.

DAVIES, S. S.; AMARNATH, V.; ROBERTS J. L. Isoketals: highly reactive  $\gamma$ -Ketoaldehydes formed from the H<sub>2</sub>-isoprostane pathway. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 128, n. 1/2, p. 85-99, Mar. 2004.

DIZDAROGLU, M. Chemical determination of free radical-induced damage do DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 10, n. 3/4, p. 225-242, 1991.

DREHER, D.; JUNOD, A. Role of oxygen free radical in cancer development. **European Journal of Cancer**, New York, v. 32 A, n. 1, p. 30-38, Jan. 1996.



ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; GÜNTER, J. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.13, n. 4, p. 341-390, Oct. 1992.

EVANS, P.; LYRAS, L.; HALLIWELL, B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. **Methods in Enzymology**, New York, v.300 (Part B), p. 145-156, 1999.

FLOHÉ, L.; BRAND, I. Kinetics of glutathione peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 191, n. 3, p. 541-549, 1969.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 47, n. 5, p. 421-428, Nov. 1982.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 264, n. 14, p. 7761-7764, May 1989.

\_\_\_\_\_. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 64, p. 97-112, July 1995.

GIASSON, B. I.; ISCHIROPOLOUS, H.; LEE, V. M. Y.; TROJANOWSKI, J. Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 32, n. 12, p. 1264-1275, June 2002.

HABIB, A.; BADR, K. F. Molecular pharmacology of isoprostanes in vascular smooth muscle. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 128, n. 1/2, p. 69-73, Mar. 2004.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox (y)-sensitive transcription factors. **Cellular Signalling**, New York, v. 14, n.11, p. 879-897, Nov. 2002a.

\_\_\_\_\_. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. **Cellular Signalling**, New York, v. 14, n. 11, p. 799-810, Nov. 2002b.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186 (Part B), p. 1-85, 1990.

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 29, (Part 2), p. 345-350, May 2001.

HANDELMAN, G. J. High-performance liquid chromatography analysis of cholesterol linoleato hydroperoxide in oxidized low density lipoproteins: calibration by conjugated diene internal standard. **Methods in Enzymology**, New York, v. 300 (Part B), p. 43-50, 1999.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 264, n. 24, p. 13963-13966, Aug. 1989.

JANSEN, L. J.; PREMJI, M.; NETHERTON, S.; CATALI, A.; COX, G.; KESHAVJEE, S.; CRANKSHAW, S. J. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, New York, v. 295, n. 2, p. 506-511, Nov. 2000.

JANSEN, L. J. The pulmonary biology of isoprostanes. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 128, n.1/2, p. 101-116, Mar. 2004.

JANSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure (Theochem.)**, Amsterdam, v. 666, n. 1/2, p. 387-392, Mar. 2003.

JOVANOVIC, S. V.; CLEMENTS, D.; Mc LEOD, K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down Syndrome. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 25, n. 9, p. 1044-1048, Dec. 1998.

KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signalling. **Cellular Signalling**, New York, v. 11, n. 1, p. 1-14, Jan. 1999.

KEANEY, J. F.; VITA, J. A. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. **Progress in Cardiovascular Diseases**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 129-154, Sep./Oct. 1995.

KUROSAWA, K.; SHIBATA, H.; HAYASHI, N.; SATO, N.; KAMADA, T.; TAGAWA, K. Kinetics of hydroperoxide degradation by NADPH-glutathione system in mitochondria. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 108, n. 9, p. 9-16, July 1990.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A-G.; AHN, B-W; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of Carbonyl content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, (Part B) p. 464-485, 1990.

LINTON, S.; DAVIES, M. J.; DEAN, R. T. Protein oxidation and ageing. **Experimental Gerontology**, Elmsford, v. 36, n. 9, p. 1503-1518, Sept. 2001.

LOO, G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 14, n. 2, p. 63-73, Feb. 2003.

LUNEC, J.; HOLLOWAY, K. A.; COOKE, M. S.; FAUX, S.; GRIFFITHS, H. R.; EVANS, M. D. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosina: redox regulation of DNA repair in vivo? **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 33, n. 7, p. 875-885, Oct. 2002.

MARKLUND, S. L. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cells lines. **The Biochemical Journal**, London, v. 266, n. 1, p. 213-219, Feb. 1990.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, Nov. 1969.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 17, n. 3, p. 235-248, Sept. 1994.

MOORE, K. Isoprostanes and the liver. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 128, n. 1/2, p. 125-133, Mar. 2004.

MOREL, I.; ABALEA, V.; CILLARD, P.; CILLARD, J. Repair of oxidized DNA by flavonoid myricetin. **Methods in Enzymology**, New York, v.335, p. 308-316, 2001.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's Biochemistry**. 24. ed. Stamford: Appleton & Lange, 1996. 868 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 973 p.

NIE, G.; WEI, T.; SHEN, S.; ZHAO, B. Polyphenol protection of DNA against damage. **Methods in Enzymology**, New York, v. 335, p. 232-244, 2001.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, Dec. 2001.

OGURA, Y. Catalase activity at high concentration of hydrogen peroxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 57, n. 2, p. 288-300, Aug. 1955.

PRATICÒ, D.; BARRY, O. P.; LAWSON, J. A.; ADIYAMAN, M.; HWANG, S. W.; KHANAPURE, S. P.; IULIANO, L.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G. A. IPF2 alfa-I: an index of lipoperoxidation in humans. **Proceedings of the National of Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 7, p. 3449-3454, Mar. 1998.

REMACLE, J.; LAMBERT, D.; RAES, M.; PIGEOLET, E.; MICHIELS, D.; TOUSSAINT, O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability: confrontation between theoretical and experimental data. **The Biochemical Journal**, London, v. 286, (Part 1), p. 41-6, Aug. 1992.

ROBERTS II, J. L.; FESSEL, J. P. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 128, n. 1/2, p. 173-186, Mar. 2004.

ROKACH, J.; KIM, S.; BELLONE, S.; LAWSON, J. A., PRATICÒ, D.; POWELL, W. S.; FITZGERALD, G. A. Total synthesis of isoprostanes: discovery and quantitation in biologicals systems. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 128, n. 1/2, p. 35-36, Mar. 2004.

RYTER, S. W.; TYRREL, R. M. Singlete molecular oxygen ( $^1O_2$ ): a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 24, n. 9, p. 1520-1534, June 1998.

SIES, H. **Oxidative stress**. London: Academic, 1985. 507 p.

\_\_\_\_\_. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, July 1993.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, New York, v. 327, n. 7, p. 649-662, July 2004.

STADTMAN, T. C. Selenocysteine. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 65, p. 83-100, July 1996.

STIPANUK, M. H. **Biochemical and physiological aspects of human nutrition**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. 1007 p.

SUN, Y.; OBERLEY, L. W. Redox regulation of transcriptional activators. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 21, n. 3, p. 335-348, Feb. 1996.

SUN, Q. A.; WU, Y.; ZAPPACOSTA, F.; JEANG, K. T.; LEE, B. J.; HATFIELD, D. L. GLADYSHEV, V.N. Redox regulation of cell signalling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 35, p. 24522-24530, Aug. 1999.

TABER, F. T.; HOERNER, R. S.; HERR, J. R.; GLEAVE, M. D.; KANAI, K. K.; PINA, R.; JIANG, Q.; XU, M. The diazo Ketone approach to the isoprostanes. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v.128, n. 1/2, p. 57-67, Mar. 2004.

TAN, K. H.; MEYER, D. J.; COLES, B.; GILLIES, N.; KETTERER, B. Detoxication of peroxidized DNA by glutathione transferases. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 15, n. 4, p. 628-629, Aug. 1987.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **The Biochemical Journal**, London, v. 191, n. 2, p. 421-427, Nov. 1980.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; AUMANN, K. D.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D.; FLOHE, L. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 252, p. 38-53, 1995.

VAN KUIJK, F. J. G. M.; SEVANIAN, A.; HANDELMAN, G. J.; DRATZ, E. A. A new role for phospholipase A<sub>2</sub>: protection of membranes from lipid peroxidation damage. **Trends in Biochemical Sciences**, Amesterdam, v. 12, n. 1, p. 31-34, 1987.

WARNER, R. H. Superoxide dismutase, aging and degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 17, n. 3, p. 249-258, Sept. 1994.

WITZTUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **The Lancet**, London, v. 344, n. 8925, p. 793- 795, Sept. 1994.

WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. The Oxidative modification hypotesis of atherosclerosis: does it hold for humans? **Trends in Cardiovascular Medicine**, New York, v. 11, n. 3/4, p. 93-102, Apr. / May 2001.

ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Essencial role of seleniun in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 24, p. 18121-18128, June 2000.