

O PARADOXO DA VIDA AERÓBICA

THE AEROBIC LIFE PARADOX

Pinto WJ¹, Fernandes CC², Santos FGA², Lacerda RF², Treto, RRR¹

1 Centro de Ciências da Saúde e Desporto da Universidade Federal do Acre.

2 Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, da Universidade Federal do Acre.

RESUMO - Os radicais livres estão intimamente relacionados à vida aeróbica na Terra, seja ela vegetal ou animal, tal fato decorre da natureza química do oxigênio que, embora seja um poderoso oxidante, é quase impossível evitar reações de oxidação secundária, ou seja, oxidações não relacionadas aos processos bioquímicos de obtenção de ATP. Embora existam outras fontes celulares de geração de radicais livres tais como as cicloxigenases e peroxissomas a maior parte é gerada na mitocôndria. Em vários pontos ao longo da cadeia de citocromos, elétrons derivados do NADH ou do FADH podem reagir diretamente com o oxigênio dando origem as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's). Assim, a respiração celular aeróbica forneceu um ganho energético incomparavelmente superior aos processos fermentativos, contudo, conduziu as células a um ambiente altamente oxidante. Por essa razão, as células desenvolveram uma poderosa maquinaria enzimática antioxidante. Essa revisão trata da discussão aprofundada dos elementos e processos envolvidos na fosforilação oxidativa com enfoque na geração de ERO's fornecendo assim um ponto de vista não convencional dos processos mitocondriais de obtenção de energia. Apresenta a utilização do oxigênio como acceptor final de elétrons em organismos aeróbios como uma saída bem sucedida para o desenvolvimento de organismos mais complexos, mas que, inexoravelmente conduz esses organismos a um colapso lento e progressivo uma vez que expõem as células a um ambiente fortemente oxidativo.

PALAVRAS CHAVE: Mitocôndria, radicais livres, fosforilação oxidativa, cadeia respiratória.

ABSTRACT - *The free radicals are intimately related to the aerobic life in the Earth, vegetable or animal, this fact elapses of the chemical nature of the oxygen that, although it is a powerful oxidant agent, it is almost impossible to avoid reactions of secondary oxidation, in other words, oxidations not related to the biochemical processes of obtaining of ATP (Sorg, 2004). Although other cellular sources of free radicals generation like cicloxigenases and peroxissomes for exemple most of it is generated in the mitochondria (Lambeth, 2004; Balaban et al., 2005). In several points along the citochomes chain, electrons from NADH or of FADH can react directly with the oxygen creating reactivate species of oxygen (ROS's). Like this, aerobic cellular process supplied an incomparable increase of energy by the cell when it is compare to the fermentative process, however, it led they to highly oxidant moiety. For that reason, the cells developed a powerful enzymatic antioxidant apparatus. That revision treats of the deepened discussion of the elements and processes involved in the phosporilative oxidation with focus in the generation of ROS's supplying like this a point of view non conventional of the mitochondrial energy process. It presents the use of the oxygen as electron final acceptor in aerobics organisms as an efficient for the development of more complex organisms, but that, inexorably it leads those organisms to a slow and progressive collapse once they expose the cells to an strongly oxidative moiety.*

KEY WORDS: Mitochondria, free radicals, oxidative phosphorilation, electron transport chain.

Autor para correspondência: Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto Wagner.wp@gmail.com

Campus Universitário Reitor Aulio Gelio Alves de Souza - Rodovia BR 364, nº 6637 (Km 04) – Distrito Industrial Caixa Postal 500 ☒ Cep: 69915-900 - Rio Branco - Acre ☒ PABX: (0xx68) 3901-2500 Centro de Ciências da Saúde (CCSD)-sala107

INTRODUÇÃO

O paradoxo da vida aeróbica, ou o “paradoxo do oxigênio”, refere-se ao fato de que a maioria das células não pode existir sem o oxigênio, mas, ele é inerentemente perigoso à sua existência. Este “aspecto negativo” desse gás está diretamente relacionado ao fato de que cada átomo de oxigênio tem um elétron não pareado em sua camada de valência externa, e oxigênio molecular apresenta dois elétrons não pareados em sua camada de valência. Assim, o oxigênio atômico é um radical livre e oxigênio molecular é um bi-radical. A redução tetravalente do oxigênio pela cadeia de respiratória mitocondrial que conduz à formação de água, é considerado um processo relativamente seguro, no entanto, a redução parcial do oxigênio gera univalente intermediários reativos. O ambiente redutor do meio celular oferece amplas oportunidades de oxigênio para que o mesmo sofra redução univalente.

Assim, o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil extremamente reativos são produtos comuns em um ambiente aeróbico, e estes agentes parecem ser responsáveis pela toxicidade de oxigênio. Para sobreviver em um ambiente tão “hostil”, os organismos vivos geram - ou obtêm de seu ambiente - uma variedade de agentes antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis. Além disso, uma série de enzimas antioxidantes, cujo papel é o de interceptar e inativar intermediários de oxigênio reativos, é sintetizada por todos os organismos aeróbios conhecidos.

Embora extremamente importante, as enzimas antioxidantes e compostos antioxidantes não enzimáticos não são completamente eficazes na prevenção da oxidação de celular. Para lidar com os danos

celulares que continuam a ocorrer, uma série de enzimas de reparação, de moléculas importantes tais como, proteínas, lipídeos e DNA, é sintetizada. Finalmente, uma vez que o grau de estresse oxidativo pode variar ao longo do tempo, os organismos são capazes de adaptar-se a tais tensões flutuantes por induzir a síntese de enzimas antioxidantes e por promover a remoção/reparação de danos moleculares. Contudo, apesar do eficiente mecanismo antioxidante previamente descrito danos celulares continuam a ser um resultado inevitável da atividade aeróbica.

As mitocôndrias são organelas que geram energia na forma de gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$), o qual por sua vez é utilizado para todas as operações bioquímicas que ocorrem na célula. A geração desse potencial energético se dá através de uma série de reações oxidativas que tem lugar nos complexos protéicos da cadeia respiratória localizados na membrana mitocondrial interna¹. Os transportadores de elétrons estão organizados, seqüencialmente, em quatro complexos supramoleculares inseridos na membrana: complexo I: NADH – ubiquinona oxidorredutase; complexo II: succinato desidrogenase; complexo III: ubiquinona – citocromo c oxidorredutase e complexo IV: citocromo c oxidase.

A cadeia respiratória pode ser mais abundante em mitocôndrias cujo metabolismo energético é maior, por exemplo, uma mitocôndria de um hepatócito típico pode apresentar cerca de 10 mil sistemas de transporte de elétrons (cadeia respiratória) enquanto que mitocôndrias de cardiomiócitos podem dispor de mais de 30 mil sistemas transportadores de elétrons e conseqüentemente maior superfície formada por cristas internas. Tecidos

com taxa metabólica elevada tais como cérebro, coração e néfrons estão sujeitos a maior estresse oxidativo uma vez que as mitocôndrias devem operar com taxas mais altas de transferência de elétrons além de apresentarem potencial transmembranar altamente polarizada².

A necessidade do oxigênio como acceptor final de elétrons para a cadeia respiratória é que torna essa reação aeróbia. Contudo, uma pequena fração do oxigênio consumido não sofre redução a H₂O e dá origem a espécies reativas de oxigênio (ERO's), os radicais livres. O termo radical livre designa o átomo ou molécula altamente reativo, que apresenta elétrons não pareados em sua última camada eletrônica³. Considera-se que as mitocôndrias são as maiores fontes de ERO's e também são o alvo primário de seus efeitos deletérios.

De fato, um átomo apresenta elétrons que orbitam ao redor do núcleo ocupando espaços com quantidades de energia características denominadas **níveis eletrônicos** ou **camadas eletrônicas**. Uma camada eletrônica é constituída por um grupo de orbitais

atômicos com o mesmo valor de número quântico principal *n*. Para os átomos conhecidos atualmente, os elétrons ocupam 7 níveis de energia (camadas de elétrons), representados por letras maiúsculas: K, L, M, N, O, P e Q, e identificados através de "números quânticos", denominados "principais" ou "primários", que são, respectivamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e seus subníveis, s, p, d, f. Essa condição de não pareamento eletrônico na última camada confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. O ânion superóxido (O₂⁻) é uma das ERO's passíveis de serem formadas no ambiente mitocondrial. A formação do oxigênio molecular (O₂) compreende a interação dois elétrons solitários do subnível *p* de um elemento oxigênio com outro formando um composto estável com representado na letra A da figura 1. No entanto, quando ocorre redução incompleta do O₂ esse acepta um elétron, dando origem ao radical superóxido (O₂⁻) que é eletronicamente instável em função de possuir número ímpar de elétrons na última camada L. Sua representação eletrônica está na letra B da figura 1.

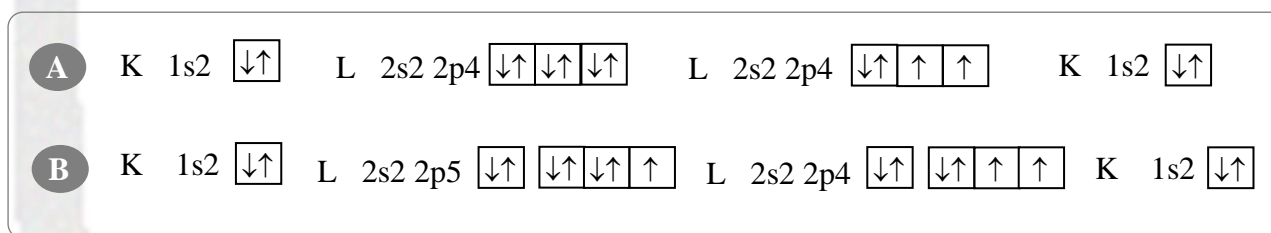


Figura 1 - Representação da distribuição eletrônica oxigênio molecular, letra A, e ânions superóxido, letra B.

Os radicais livres existem na natureza em intervalo de tempo de milissegundos, isso porque após sua geração buscam imediatamente o equilíbrio químico, muitas vezes aceptando elétrons de substâncias químicas extremamente importantes

para a homeostasia celular convertendo-as em radicais livres ou mesmo interferindo em suas funções biológicas. A essa cadeia de eventos de acepção de elétrons por parte dos radicais livres no sentido de restaurar seu equilíbrio eletrônico dá-se o nome

de cascata oxidativa. Os radicais livres estão intimamente relacionados à vida aeróbica na Terra, seja ela vegetal ou animal. Isso porque a maior parte dos seres vivos utiliza o O₂ como aceptor final de elétrons em seus eficientes processos de obtenção de energia.

No entanto, sendo o oxigênio um poderoso oxidante, é quase impossível evitar reações de oxidação secundária, ou seja, oxidações não relacionadas aos processos bioquímicos de obtenção de ATP⁵. Essas oxidações secundárias poderiam ter efeitos seriamente deletérios para as células se não fossem neutralizados por uma eficiente maquinaria bioquímica antioxidante. A partir dessa evidência teórica introduziu-se conceito de estresse oxidativo, no sentido de descrever uma condição em que a geração de ERO's ou outras formas químicas com potencial deletério para a célula suplantam os mecanismos capazes de neutralizá-las^{6,7}. Na verdade, ERO's são gerados em decorrência da oxidação parcial do oxigênio e, embora os organismos apresentem grande capacidade de adaptação prevenindo essas reações, uma fração pequena de radicais livres forma-se inevitavelmente durante a respiração celular aeróbia escapando do aparato antioxidante celular⁸. De fato, em condições fisiológicas, cerca de 1 a 2% do oxigênio consumido é convertido em ERO's.

A TOXIDADE DO OXIGÊNIO

A vida na Terra surgiu na ausência de oxigênio e, foi nessas condições que os primeiros organismos criaram mecanismo para produzir energia, um desses mecanismos é a glicólise, fase anaeróbia de produção de ATP's presente nas células eucariontes e procariontes. Posteriormente, na Terra primitiva os níveis de oxigênio começaram a aumentar e, possivelmente nesse período as

mitocôndrias fundiram-se com as primeiras células tornando possível o aproveitamento do oxigênio para a continuação da oxidação do piruvato. De fato, a teoria da endossimbiose, criada por Lynn Margulis, propõe que organelas ou organóides, que compõem as células tenham surgido como consequência de uma associação simbiótica estável entre organismos há cerca de dois bilhões de anos atrás⁶. Mais especificamente, esta teoria postula que os cloroplastos e as mitocôndrias têm origem comum em um procarionte autotrófico—provavelmente um antepassado das cianobactérias atuais - que viveu em simbiose com um organismo unicelular, mas provavelmente de maiores dimensões, obtendo assim proteção e fornecendo ao hospedeiro energia. Christian de Duve (premiado com o prêmio Nobel de medicina, em 1974) considera que os peroxissomas podem ter sido os primeiros endosimbiontes, que permitiram às células adaptar-se à quantidade crescente de oxigênio molecular na atmosfera da Terra. No entanto, como estas organelas também não possuem DNA, esta teoria é considerada especulativa e sem bases sólidas.

De qualquer forma, diversos fatores sustentam o fato de que mitocôndrias e cloroplastos tiveram origem em bactérias endossimbiontes tais como: a) Tanto as mitocôndrias como os cloroplastos possuem DNA bastante distinto do que existe no núcleo celular e em quantidades semelhantes ao das bactérias; b) As mitocôndrias utilizam um código genético diferente do da célula eucariótica hospedeira e semelhante ao das bactérias e Archaea; c) Ambos (cloroplastos e mitocôndrias) são envolvidos por duas ou mais membranas e a mais interna apresenta diferenças na composição em relação às outras membranas da célula e

semelhanças com a dos procariotas; d) Ambos se formam por fissão binária, independente da divisão celular como é comum nas bactérias e em algumas algas, como a *Euglena*. e) Tanto as mitocôndrias como os cloroplastos possuem genomas muito pequenos, em comparação com outros organismos, o que pode significar um aumento da dependência destas organelas depois da simbiose se tornar obrigatória, ou melhor, passar a ser um organismo novo^{9,10}.

As células passaram então a aproveitar o poderoso potencial oxidante do oxigênio para a obtenção de energia, surgia então a fosforilação oxidativa. Contudo, as células não abandonaram a glicólise, embora sua eficiência de geração de energia fosse muito inferior à obtida por meio da fosforilação oxidativa. A glicólise permanece então como um elo metabólico na evolução de organismos eucariontes e procariotes. De fato, as estruturas das enzimas presentes na glicólise e na fosforilação oxidativa apresentam grande homologia em muitos animais¹¹. A fosforilação oxidativa é um processo no qual tem lugar um complexo aparato de proteínas denominadas complexos I, II, III e IV, apresentando 42, 4, 11 e 13 subunidades (Figura 2), sendo que somente as bombas de prótons (complexos I, III e IV) apresentam subunidades adicionais nos organismos eucariotas (19, 8 e 9 respectivamente)¹¹. Assim, a capacidade dos organismos em aproveitar o oxigênio para continuar a oxidação do piruvato gerado na glicólise proporcionou um imenso rendimento energético, mas também propiciou o aparecimento de substâncias extremamente deletérias à homeostasia celular, os radicais livres.

Quimicamente os radicais livres possuem um elétron despareado na última camada de valência e por sua

natureza instável promovem danos moleculares que se propagam em cadeia^{12,13}. Como consequência, pode doar elétrons — atividade redutora — ou retirar elétrons de outras substâncias para se estabilizar — atividade oxidante. Vários elementos químicos podem gerar radicais livres (Tabela 1); porém, por razões de natureza eletrônica, a molécula de oxigênio apresenta forte tendência a formar esses radicais. Os principais radicais livres de importância biológica, formados a partir do oxigênio molecular são o radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\bullet) sendo que no homem o O_2^- é o mais comumente formado¹⁴. O oxigênio pode ainda combinar-se para formar H_2O_2 e, embora essa molécula não seja considerada um radical livre propriamente dito pode originar o ânion OH^\bullet , considerado o radical livre mais reativo existente¹⁵ sendo o responsável pela maior parte dos danos oxidativos nas membranas celulares e pela modificação do LDL-colesterol, passo importante para a formação da placa de aterosclerose.

Tabela 1 – Substâncias que originam radicais livres.

Elemento	Radical	Propriedades
Oxigênio	Superóxido O_2^-	Provável mediador de sinais em vasos. Relativamente pouco reativo, atravessa membranas celulares através de canais iônicos.
Oxigênio	H_2O_2	Relativamente inerte por si só, pode, contudo originar radicais citotóxicos. Bastante permeável a membranas biológicas.
Oxigênio	Hidroxil OH	O mais potente oxidante conhecido, passível de ser formado em condições biológicas
Nitrogênio	NO	Radical livre gasoso. Pouco reativo <i>per se</i> , lipossolúvel e altamente permeável à membranas biológicas.
Nitrogênio	$ONNO^-$	Dá origem a um potente oxidante, o íon nitrônio (NO_2^+)
Carbono	Metil	Possível envolvimento em danos ao DNA
Enxofre	Tiol	Intermediário da oxidação e interconversão de tióis. Significado biológico incerto.

Adaptado de Halliwell B & Gutteridge⁷

Embora existam outras fontes celulares de geração de ERO's tais como as cicloxigenases e peroxissomas a maior parte dos radicais livres (cerca de 90%) são gerados na mitocôndria^{16,17}. Esses radicais são decorrentes da fosforilação oxidativa, um processo que utiliza a oxidação controlada de NADH e FADH no sentido de gerar uma diferença de potencial elétrico ($\Delta\Psi$) entre a membrana mitocondrial interna e externa (espaço intermembranar) à medida que ocorre o fluxo de elétrons pela cadeia transportadora (Figura 2). Na verdade, a energia decorrente do transporte de elétrons através da cadeia respiratória é dissipada pela ejeção de prótons de hidrogênio para o espaço existente entre a membrana mitocondrial externa e membrana mitocondrial interna, dando origem a força próton motriz que é

utilizada para a fosforilar o ADP via F1-F10 ATP'ase.

Em vários pontos ao longo da cadeia de citocromos, elétrons derivados do NADH ou do FADH podem reagir diretamente com o oxigênio dando origem a espécies intermediárias de oxigênio reativo, os radicais de oxigênio. Isso é possível graças à configuração eletrônica da molécula de oxigênio que apresenta a propriedade de aceitar um elétron de cada vez (tendência monoelétrica do oxigênio). É por essa razão que, os radicais livres mitocondriais são necessariamente espécie oriunda do oxigênio, principalmente O_2^- . Nessa sequência de eventos o complexo IV da cadeia transportadora de elétrons tem a função de impedir a formação de espécies intermediárias de oxigênio, uma vez que força a reação a ocorrer numa única etapa formando ao final H_2O , ou seja,

vencendo a tendência monoelétrica do oxigênio (Figura 3).

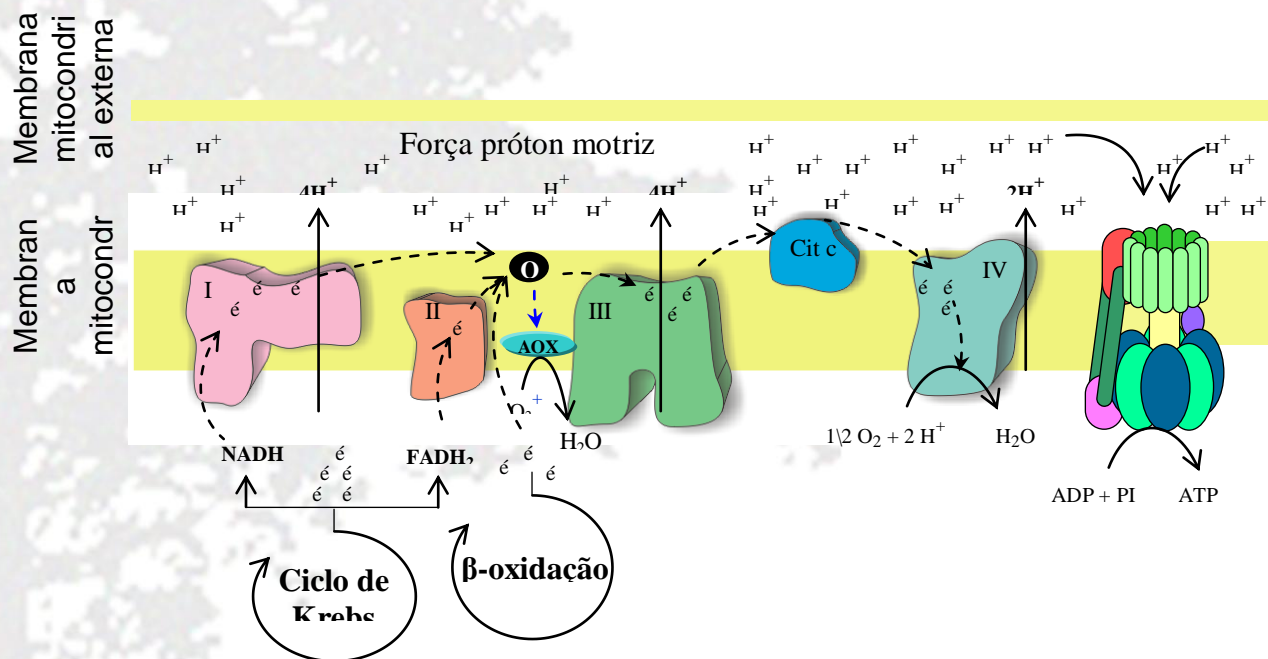


Figura 2 - Modelo da cadeia transportadora de elétrons. Os prótons no espaço intermembranar representam a força próton motriz. A grande concentração de prótons no espaço intermembranar tende a retornar para a matriz mitocondrial buscando igualar o gradiente eletroquímico. Esse fluxo de prótons se dá através da subunidade Fo da bomba de ATP sintase, quando isso acontece, a bomba sintetiza ATP. Note que o bombeamento de prótons H^+ para o espaço intermembranar ocorre somente nos complexos I, II e IV. Há ainda a presença de uma oxidase alternativa (AOX) que aceita elétrons oriundos diretamente da ubiquinona (UQ).

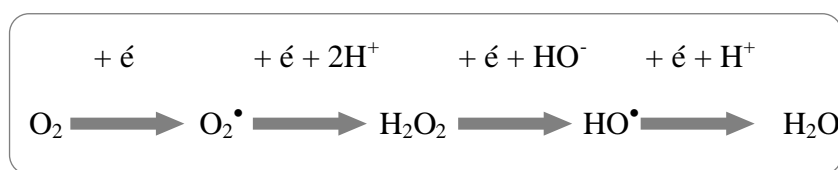


Figura 3 – Espécies intermediárias de oxigênio que podem surgir na fosforilação oxidativa em função da tendência monoelétrica do oxigênio.

Dessa forma, a cadeia de citocromos é capaz de converter a energia redox de moléculas bastante estáveis como NADH e FADH em um potencial energético $\Delta\Psi$ que se concentram na forma prótons no espaço mitocondrial intermembranar. De fato, um total de 10 H^+ são bombeados da

matriz mitocondrial para o espaço intermembranar mitocondrial para cada par de elétrons transferidos do NADH para o oxigênio. Observando com maior atenção nota-se que os dois maiores sítios de geração de radicais livres são o complexo I e o II uma vez que são locais onde ocorrem as maiores

mudanças na energia potencial dos elétrons relacionados à redução e a oxidação. Em manipulações experimentais quando se aumentou o potencial redox do complexo I ou III observou-se concomitante aumento de espécies reativas de oxigênio^{18,19} sustentando a hipótese de que o potencial redox desses sítios é relevante na formação de radicais livres.

O potencial de oxi-redução padrão de um determinado par oxidante/redutor é uma medida da estabilidade termodinâmica relativa das duas formas oxidada/reduzida: quanto maior o seu valor maior a estabilidade da forma reduzida relativamente à forma oxidada desse par. Dentre os compostos envolvidos na cadeia respiratória merece especial destaque o O₂ e o NADH. O valor positivo e elevado do potencial redox padrão do par O₂/H₂O (E^o = +0,815) significa que o O₂ é um potente oxidante e tem tendência a aceitar elétrons de outros compostos reduzindo-se a H₂O. No outro extremo da escala está o par NAD⁺/NADH cujo baixo (muito negativo; E^o = -0,315) potencial redox padrão significa que o

NADH tem uma grande tendência a ceder elétrons oxidando-se a NAD⁺. A velocidade com que o processo ocorre depende de catalisadores: os complexos protéicos I, III e IV da cadeia respiratória. Para melhor compreender a dinâmica de formação de espécies reativas no interior da mitocôndria pode-se construir um modelo teórico. Para tanto, define-se que a energia líquida necessária à redução do oxigênio será denominada E_{ox}, que pode ser estimada como a diferença entre o potencial redox para a cessão de um único elétron ao oxigênio (E^o = -160mV) e o potencial redox de um doador de elétron qualquer em um determinado local de reação²⁰. É importante ainda considerar a tensão parcial de oxigênio PO₂, assim tem-se a seguinte equação para o total de ERO's geradas na matriz mitocondrial (Figura 4). Na equação "sítio" representa todas as ERO's geradas na mitocôndria de uma determinada célula. Uma vez que a concentração de oxigênio é muito maior que a de O₂⁻ ou de H₂O₂, a reversão da reação na equação pode ser desconsiderada²¹.

$$Q_{\text{EROS's}} \approx \sum_{\text{sítio}+n}^{\text{sítio}} (K_{\text{OXsítio}} E_{\text{OXsítio}} [\text{sítio}]) \quad (\text{Balaban et al., 2005})$$

Onde:

E_{ox}: Força que direciona a redução do oxigênio.

PO₂: Tensão de oxigênio.

K: Constante de reação de primeira ordem.

Q_{EROS}: Quantidade total de formação de espécies reativas de oxigênio.

Sítio: Representa todos os sítios mitocondriais geradores de ERO's em uma dada célula.

Figura 4 – Equação que permite calcular a quantidade de espécies reativas de oxigênio formadas durante os processos aeróbios de obtenção de energia.

Baseado nessa abordagem, qualquer alteração na fosforilação oxidativa que modifique algum dos termos presentes na equação incluindo a quantidade de mitocôndrias ou mesmo os próprios citocromos poderia aumentar a gênese de radicais livres. Por exemplo, mantendo-se a mitocôndria em estado reduzido, ou seja, sem aporte de ADP e nem de Pi para a fosforilação oxidativa ou ainda administrando-se inibidores do transporte de elétrons²² ocorre aumento de E_{OX} no sítio I ou III conduzindo a um aumento de $Q_{ERO's}$ ^{22,23,24}.

Experimentalmente pode-se gerar uma quantidade grande de radicais livres revertendo-se o fluxo de elétrons na cadeia respiratória, essa condição é alcançada quando há succinato na presença de um inibidor do sítio III, gera-se assim um fluxo reverso de elétrons do sítio II para o sítio I^{22,24}. A reversão do fluxo de elétrons pode ser responsável pelo aumento dos níveis de radicais livres durante a β -oxidação que, também gera elétrons para o sítio II via FAD²⁵. Outro exemplo de aumento endógeno de E_{OX} e $ERO's$ é durante a apoptose, nesse caso, ocorre a liberação da citocromo "c" resultando em um bloqueio no fluxo de elétrons que aumenta no sítio I¹⁸. Todas as evidências indicam, portanto, que os radicais livres são um subproduto inevitável do eficiente processo de respiração celular aeróbia, mas cuja gênese pode ser reduzida por meio de substâncias denominadas desacopladores.

A MITOCÔNDRIA E A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Um dos maiores desafios do campo de estudo da biologia dos radicais livres é determinar qual é o sítio específico na cadeia respiratória onde ocorre a formação de radicais livres em níveis patológicos. A respiração celular aeróbia é a maior fonte de radicais

livres, uma vez que cerca de 0,2% de todo o oxigênio consumido não sofre conversão a água mas sim em espécies reativas de oxigênio, (sobretudo ânions superóxidos) em condições celulares quiescentes^{24,26}. Os ânions superóxidos podem causar estresse oxidativo com consequente redução das funções mitocondriais se não forem adequadamente dismutados. A geração de ânions superóxidos ocorre mais provavelmente quando os carreadores redox apresentam alto potencial de transferência de energia (elétrons), panorama que está presente no espaço compreendido entre a membrana mitocondrial externa e interna conhecido como espaço intermembranar²⁷. As enzimas mitocondriais aconitase, α -cetoglutarase desidrogenase, piruvato desidrogenase, são grandes geradoras de $ERO's$, incluindo os complexos da cadeia transportadora de elétrons I, II e III^{28,29,30}. Outra fonte poderosa de geração de $ERO's$ em mitocôndrias de hepatócitos e cardiomiócitos é a enzima óxido nítrico sintase (NOS). Ao contrário das células endoteliais onde a NOS está presente no citosol em cardiomiócitos e hepatócitos essa enzima encontra-se na matriz mitocondrial^{31,32}. A produção fisiológica de NO por parte da NOS mitocondrial deve-se a regulação minuto-a-minuto da citocromo-c-oxidase, taxas elevadas de NO promovem redução da atividade da citocromo-c-oxidase por meio de S-nitrosilação dos resíduos de cisteína do complexo IV e I da citocromo-c-oxidase^{31,33}. O óxido nítrico deprime a atividade da citocromo-c-oxidase porque compete com o oxigênio pelo sítio ativo dessa enzima, outros gases também interferem reduzindo o desempenho da citocromo-c-oxidase como, por exemplo, o monóxido de carbono e o ácido sulfídrico².

INTERAÇÃO DE $ERO's$ COM COMPONENTES DA MEMBRANA

MITOCONDRIAL – Os radicais livres são ineficientes em romper membranas biológicas, sendo assim a membrana mitocondrial atua como um escudo que impede a propagação do dano oxidativo para além das fronteiras mitocondriais. Contudo, interações de ERO's com ácidos graxos polinsaturados geram hidroperóxidos lipídicos e α - β -aldeídos insaturados os quais são altamente eletrofílicos e estáveis propagando-se de forma eficiente através das membranas mitocondriais sendo capazes de reagir com proteínas e ácidos nucleicos celulares³⁴. Essa cadeia de reações de peroxidação lipídica está presente em condições fisiopatológicas tais como a gênese da placa de atheroma, isquemia, injúria de reperfusão dentre outras¹. Um dos primeiros alvos das espécies reativas de oxigênio geradas no interior das mitocôndrias é a cardiolipina, um fosfolípido aniônico presente na membrana mitocondrial interna cujas funções incluem, estabilização da membrana, permitindo o correto funcionamento da cadeia respiratória, uma vez é necessária para o processo de transferência de elétrons nos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial e para a organização estrutural dos complexos III e IV em um supercomplexo³⁵. Além disso, a

cardiolipina também ancora o citocromo "c" na membrana mitocondrial interna de modo que a oxidação dos grupos acila das cadeias altamente insaturadas da cardiolipina reduz sua interação com o citocromo "c" causa seu desprendimento da membrana mitocondrial interna¹. Esse evento associado ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa resulta na liberação do citocromo "c" no citosol da célula e formação de vesículas de apoptossomos com consequente ativação da cascata das caspases culminando na cadeia de eventos que conduz à apoptose³⁶.

A aconitase-2 (ACO-2) é uma proteína ferro-enxofre cuja função é promover a reação de isomerização do citrato a isocitrato no ciclo de Krebs. A presença do ferro na ACO-2 a torna susceptível ao ataque de ERO's, de fato, o papel dos metais na formação *in vitro* de ERO's é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss (Figura 5). Embora seja possível a reação de Haber-Weiss com os íons cobre ela normalmente ocorre junto ao ferro já que é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais apto para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas⁴.

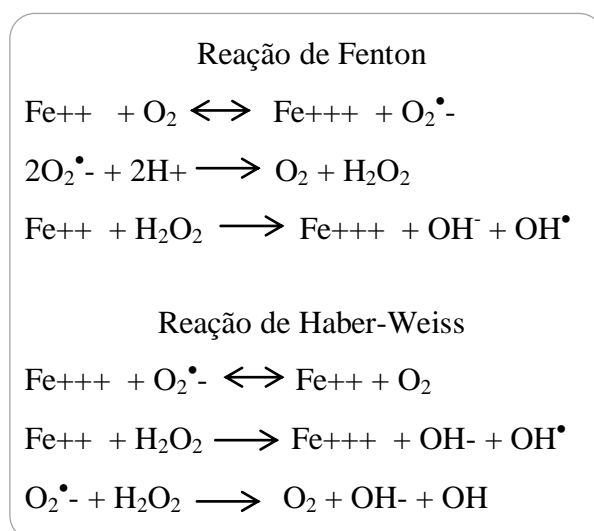


Figura 5 – Reação de Fenton e de Haber-Weiss. Em ambas os metais catalisam a formação do ânion hidroxil (OH^{\bullet}).

A prolongada exposição das mitocôndrias a espécies reativas de oxigênio resulta em desagregação dos centros ferro-enxofre $[4Fe-4S]^{+2}$, carbonilação e degradação de enzimas

O COMPLEXO I COMO FONTE DE RADICAIS LIVRES

– Os elétrons transportados pelo NADH entram na cadeia respiratória através do complexo I, uma estrutura proteica formada por 45 polipeptídeos³⁷. Subsequentemente, uma molécula de Flavina Mononucleotídeo aceita os elétrons e os conduz através de sete centros ferro-enxofre transferindo-s à UQ. A estrutura do braço solúvel do complexo I, onde estão presentes o grupo FMN e os sete centros ferro-enxofre é bem conhecida e admite que o trânsito de elétrons através dessa estrutura está relativamente bem protegido da interação com o oxigênio³⁷. Os sítios de geração de $O_2^{\bullet-}$ no complexo I são menos conhecidos quando comparados com o complexo III. A carência de detalhes relacionados ao processo decorre da grande complexidade da proteína. Sabe-se que o $O_2^{\bullet-}$ não é permeável em membranas biológicas por conta de sua carga fortemente negativa, em contrapartida, sua forma protonada $HO_2^{\bullet-}$ (pK_a , 4,9) é permeável, contudo, representa menos de 0,2%³⁸. Nas células, cada compartimento delimitado por uma membrana apresenta sua própria enzima superóxido dismutase, capaz de neutralizar e ação deletéria do $O_2^{\bullet-}$ e a superexpressão de uma enzima não compensa a perda de outra em outro compartimento celular³⁹. Dessa forma,

estabelecendo assim uma conexão entre estresse oxidativo e inativação enzimática, tal como ocorre na isquemia e na injúria de reperfusão¹.

dado o fato de que o superóxido é muito seletivo em seus “alvos” e que, uma vez lançado em um compartimento ligado à membrana, a compreensão da unilateralidade da liberação do ânion superóxido por seus sítios de geração é essencial para esclarecer o papel da produção de superóxido mitocondrial em diversas condições fisiopatológicas³⁹. Através da inibição do complexo I utilizando-se rotenona foi possível determinar o *locus* de formação de ânions superóxido reativas no complexo I. Ele localiza-se em algum sítio entre a flavina (FMN) e o local de interação da rotenona⁴⁰, de modo que a geração de superóxidos se dá em algum local da fração hidrofóbica do complexo I, ou seja, no braço que está inserido na membrana mitocondrial interna (Figura 6). A primeira demonstração de que o complexo I é uma fonte geradora de espécies reativas de oxigênio deu-se quando Hinkle em 1967⁴¹ trabalhando com mitocôndrias isoladas desacoplou a formação de água como produto final da cadeia transportadora de elétrons⁴¹. Subsequentemente mostrou-se que o complexo I isolado na presença de NADH produz $O_2^{\bullet-}$ e essa formação de $O_2^{\bullet-}$ é aumentada na presença de rotenona, um inibidor de UQ²¹. O mecanismo de formação de $O_2^{\bullet-}$ por parte do complexo I isolado está agora razoavelmente bem compreendido⁴².

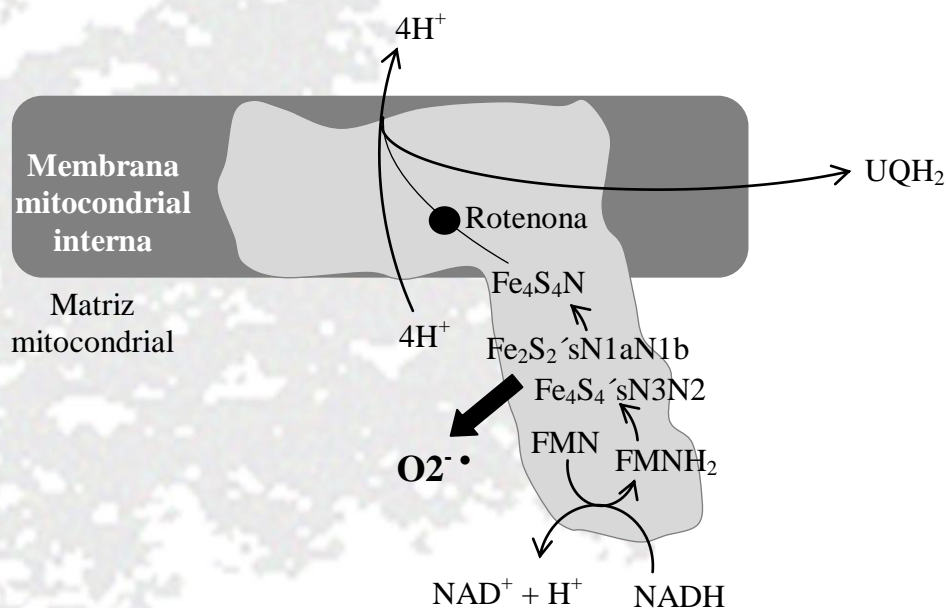


Figura 6 – Sítio de formação de superóxido no complexo I. Note que a rotenona atua como inibidora do fluxo de elétrons. Os superóxidos gerados no complexo I são liberados na matriz mitocondrial.

O complexo I produz $O_2^{\bullet-}$ a partir da reação de O_2 com FMN totalmente reduzido, e a proporção do FMN, que é completamente reduzido, é definido pelo razão $NADH/NAD^+$ ⁴². Este modelo explica por que a inibição do complexo I por meio da rotenona causa geração de $O_2^{\bullet-}$ já os elétrons serão conduzidos de volta à FMN que por sua vez irá ser responsável pela formação de $O_2^{\bullet-}$.

Em mitocôndrias intactas a proporção FMN totalmente reduzido parece ser um ponto chave na relação $NADH/NAD^+$, de modo que, a inibição da cadeia respiratória por meio de mutações, isquemia, alterações no citocromo c ou acúmulo de NADH em função da baixa demanda de ATP e conseqüentemente baixa taxa respiratória pode aumentar a razão $NADH/NAD^+$ conduzindo assim à formação de $O_2^{\bullet-}$ ⁴³. Em contraste, quando a relação $NADH/NAD^+$ é relativamente baixa pequenas

quantidades de $O_2^{\bullet-}$ são formados no complexo I⁴⁴. De fato, a importância da relação $NADH/FAD^+$ na geração de $O_2^{\bullet-}$ por parte do complexo I pode ser demonstrada por meio da expressão da enzima NADH desidrogenase de leveduras, causando assim depleção do pool de NADH por meio de oxidação⁴⁵. Outra condição em que o complexo I produz grandes quantidades de $O_2^{\bullet-}$ é no transporte reverso de elétrons⁴⁶.

O Transporte Reverso de Elétrons (TRE), ocorre em mitocôndrias que estão operando em circunstâncias em que o fornecimento de elétrons reduz o *pool* de UQ, que em presença de uma força próton motriz significativa retornam de UQH_2 para o complexo I e são capazes de reduzir NAD^+ a $NADH$ ⁴⁷. A geração de $O_2^{\bullet-}$ é abolida pela rotenona, um potente inibidor do complexo I, confirmando assim que a formação dessas espécies reativas de oxigênio de fato ocorrem no complexo

⁴⁷. A produção de $O_2^{\bullet-}$ por parte do complexo I decorrente do transporte reverso de elétrons também é abolida em condições em que a força próton motriz está diminuída⁴⁸ possivelmente porque há redução das forças termodinâmicas que empurram os elétrons para a formação de $O_2^{\bullet-}$ no interior do complexo I. Curiosamente a geração de $O_2^{\bullet-}$ no complexo I é mais sensível às variações de pH, um componente da força próton motriz ($\Delta\phi$) do que aos valores do potencial de membrana ($\Delta\Psi$). Embora o mecanismo exato pelo qual o complexo I gere $O_2^{\bullet-}$ em condições de TRE não esteja ainda plenamente esclarecido a possibilidade mais simples parece ser que o TER force os elétrons para a FMN de modo que a geração de $O_2^{\bullet-}$ durante o TER assemelhe-se então à formação desse radical em condições em que FMN encontre-se reduzida em resposta à elevada relação NADH/NAD⁺⁴⁹. De fato, o difeniliodonio, um inibidor da flavina abole a geração de $O_2^{\bullet-}$ através da via de TRE por parte do complexo I⁴⁹. Contudo, isso não confirma o envolvimento da FMN na geração desse radical uma vez que o difeniliodonio tem outras interações com a mitocôndria⁴⁹.

Além disso, o desacoplamento de UQ do complexo I em condições onde estão presentes um gradiente de pH (ΔpH) geram $O_2^{\bullet-}$ de forma mais extensa do que a redução de FMN isoladamente, sugerindo um importante papel de UQ no transporte de elétrons e consequentemente na síntese reversa de $O_2^{\bullet-}$ ⁴⁸. Essas evidências sustentam o fato de que a geração de $O_2^{\bullet-}$ por parte do complexo I ocorre em diferentes circunstâncias no transporte reverso de elétrons e também da redução de FMN pelo *pool* de NADH de forma simultânea e que grande parte do $O_2^{\bullet-}$ formado durante o TRE não é produzido na FMN. Assim, se o $O_2^{\bullet-}$ não é gerado na FMN durante a TRE então o foco se

volta para a UQ onde um par de elétrons de um núcleo ferro-enzofre para UQ reduzindo-a a UQ₂, enquanto quatro prótons de hidrogênio são bombeados através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembranar por um mecanismo ainda pouco compreendido⁴⁷. A intrigante dependência do pH e de ΔpH para formação de $O_2^{\bullet-}$ durante o TRE sugere que moléculas de semiquinonas e semiquinolatos são formados durante o bombeamento protônico e reagiriam diretamente com o O_2 para formar $O_2^{\bullet-}$ ⁴⁸.

Conhecemos pouco ainda acerca da estrutura do complexo I bem como de seu exato mecanismo de bombeamento de prótons, de modo que o estudo da formação de $O_2^{\bullet-}$ através de TRE pode contribuir para melhorar nosso conhecimento sobre as particularidades moleculares do complexo I. Em suma, o complexo I produz grandes quantidades de $O_2^{\bullet-}$ por dois mecanismos: quando a relação NADH/NAD⁺ aumenta na matriz mitocondrial, levando à redução de FMN e quando o fluxo de elétrons para o *pool* de UQ ocorre em meio a elevada força próton motriz. Embora o local exato de produção de ânions superóxido durante o transporte reverso de elétrons não seja plenamente conhecido, a taxa de produção de $O_2^{\bullet-}$ em condições de TRE parece ser a mais alta que pode ocorrer em mitocôndrias⁴⁸.

O COMPLEXO III COMO FONTE D ERADICAIS LIVRES –

a cadeia transportadora de elétrons gera ânions $O_2^{\bullet-}$ como um subproduto inevitável de sua atividade. Existe considerável celeuma sobre o exato sítio de geração de radicais livres na cadeia respiratória. Contudo, é consenso que o complexo III pode contribuir de forma relevante para a formação dessas espécies químicas, já que durante o ciclo da ubiquinona

há um momento onde ocorre a formação de Q^{\bullet} e, em determinadas condições pode-se formar $O_2^{\bullet-}$ ³⁸. No entanto, muitos detalhes relacionados à formação de ERO's por parte do complexo III devem ser mais bem esclarecidos como, por exemplo, por que o complexo III libera Q^{\bullet} para o citosol e também para a matriz mitocondrial³⁸. No complexo III a transferência de elétrons do ubiquinol (QH_2) para o citocromo *c* (e o concomitante bombeamento de H^+) é catalisado pelo ciclo da ubiquinona⁴⁹. O ciclo inicia-se com a transferência de dois elétrons do último aglomerado Fe-S do complexo I para *Q*. Nesse momento, *Q* converte-se em QH_2 , transferindo um dos elétrons a um aglomerado Fe-S e posteriormente ao citocromo *c1* e, finalmente esse elétron é aceitado pelo citocromo *c*. Concomitante a essa transferência de elétrons dois H^+ são extrudidos para o espaço intermembranar. O segundo elétron é aceitado por dois citocromos *bL* e *bH* respectivamente até ser captado por outra molécula de *Q* convertendo-a em Q^{\bullet} . O elétron que segue pelos citocromos *bL* e *bH* é captado por outra molécula de *Q*.

Ao captar esse segundo elétron *Q* converte-se em Q^{\bullet} . Q^{\bullet} capta dois H^+ da matriz mitocondrial originando QH_2 que por sua vez reinicia o ciclo de transferência de elétrons e prótons. Em condições normais O^{\bullet} é imediatamente oxidada pela citocromo *bL* (próximo a matriz mitocondrial) até *Q* em função da grande solubilidade do oxigênio no ambiente hidrofóbico das membranas biológicas ele tende a se difundir pela bicamada da membrana mitocondrial podendo reagir com $O_2^{\bullet-}$ sobretudo em circunstâncias em que ocorre lentidão do fluxo de elétrons ao longo da cadeia respiratória, o que ocorre quando o potencial elétrico da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$) encontra-se elevado. Essa reação gera $O_2^{\bullet-}$, e em

função da proximidade de *Q* do espaço intermembranar o $O_2^{\bullet-}$ sendo um ânion tenderia a ser expulso da membrana mitocondrial interna para o ambiente citosólico⁵⁰. Contudo, sua migração para o citosol é desfavorecida pelo potencial eletronegativo da membrana mitocondrial interna, embora³⁸ tenham demonstrado que uma fração de $O_2^{\bullet-}$ produzido no complexo III é liberada na matriz mitocondrial. Para que isso seja possível os autores propõem dois modelos, o primeiro postula a existência de um "túnel hidrofóbico" através do qual a QH^{\bullet} (sem carga elétrica) se difundiria.

A subsequente reação de QH^{\bullet} com O_2 geraria $O_2^{\bullet-}$ com consequente liberação de um próton da semiquinona. O segundo modelo proposto por Muller et al., (2004)³⁸ sugere que, ao invés do $O_2^{\bullet-}$ o HO_2^{\bullet} (hidroperóxil, um conjugado ácido de $O_2^{\bullet-}$) pode ser diretamente formado devido a existência de um resíduo de glutamato proximal no sítio *Q* que forneceria o próton necessário à reação, embora os autores postulem que o próton seja fornecido para a oxidação do ubiquinol, independentemente do valor de pH. O HO_2^{\bullet} aí formado poderia reagir com cadeias carbônicas insaturadas de ácidos graxos que compõem os fosfolípidos da membrana mitocondrial interna causando sérios danos químicos. Durante o ciclo de *Q* o segundo elétron é primeiramente transferido ao grupo heme de *bL* (cuja localização está orientada para a face citosólica) e subsequentemente esse elétron é conduzido ao grupo heme de *bH*, o qual está situado próximo a matriz mitocondrial. Essa organização transmembranar dos dois grupos heme do citocromo *b* em lados opostos é a chave que permite a transferência de elétrons em condições de elevado $\Delta\Psi$, o que leva ao prolongamento do ciclo de Q^{\bullet} . Assim, *Q* é formado contra a força próton motriz ($AP = \Delta\phi - 59 \Delta pH$ em mV).

O prolongamento da meia vida de Q^{\bullet} favorece sua chance de interação com o oxigênio, conseqüentemente a produção de $O_2^{\bullet-}$ aumenta em condições de elevado $\Delta\Psi$ ⁵¹.

O segundo sítio de geração de Q^{\bullet} no cerne do complexo III é o sítio Q_i (Q_n) localizado na face voltada para a matriz mitocondrial e proximal ao citocromo *bH* o qual doa um elétron para Q enquanto Q^{\bullet} é novamente formado. Como consequência da oxidação do segundo QH_2 até Q , o segundo elétron completa a redução do Q^{\bullet} até QH_2 no Q_i e QH_2 retorna ao *pool* da membrana. Demonstrou-se que o $O_2^{\bullet-}$ pode escapar do espaço intermembranar em direção ao citosol através de uma porina voltagem dependente denominada VDAC (*Voltage Dependent Anion-selective Channels*) a proteína mais abundante da membrana mitocondrial externa cujas funções estão relacionadas a eventos apoptóticos. Não se sabe ao certo se o trânsito do $O_2^{\bullet-}$ através do VDAC ocorra alguma influência do $O_2^{\bullet-}$ nas propriedades físico químicas do VDAC.

DESACOPLADORES – O FREIO DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

Entende-se por desacoplador um elemento que é capaz de bloquear o fluxo de elétrons na cadeia respiratória diminuindo a eficiência na síntese mitocondrial de ATP. As proteínas desacopladoras (UCP) compõem uma família de proteínas bombeadoras de prótons localizada na membrana mitocondrial interna⁵² e têm função de translocação dos prótons e elétrons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons através da membrana interna da mitocôndria⁵³. No processo de

síntese de ATP, a cadeia respiratória transporta prótons e elétrons através da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranar, criando um gradiente de prótons.

No retorno dos prótons para a matriz mitocondrial, as proteínas ATP-sintases, numa reação acoplada, utilizam a energia para fosforilar o ADP (+ Pi) e sintetizar o ATP. Assim, tal como as ATP-sintases, as UCP's também localizam-se na membrana interna e servem como um canal alternativo para que os prótons atravessem de volta para a matriz. Quando a UCP é estimulada, a energia não é aproveitada para a fosforilação do ADP, gerando apenas calor⁵³. A geração de espécies reativas de oxigênio por parte da mitocôndria sofre um controle fisiológico pelas proteínas desacopladoras. Cinco moléculas têm sido identificadas como sendo membros da família de proteínas desacopladoras, UCP1, é a forma clássica das UCP's, e encontra-se presente no tecido adiposo marrom, UCP2 (Figura 7) distribui-se mais largamente em muitos tecidos incluindo o sistema nervoso central e músculos esqueléticos e UCP3 relacionada com o consumo de substratos energéticos, sendo regulada pela disponibilidade e metabolismo desses substratos^{53,54}. A UCP1 presente no tecido adiposo está relacionada à termogênese, enquanto que a UCP2 e UCP3 estão envolvidas na prevenção da geração de ânions superóxidos e na regulação do ciclo de ácidos graxos no interior das mitocôndrias⁵⁴. As funções da UCP4 e UCP5 não foram plenamente elucidadas, estão presentes no tecido neural, provavelmente para proteger da ação deletéria de $O_2^{\bullet-}$ em função da alta taxa metabólica desse tecido⁵⁵.

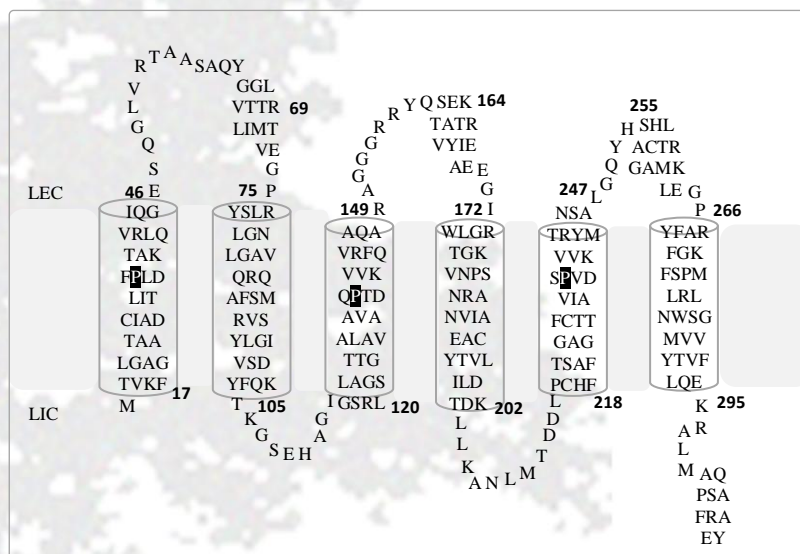


Figura 7 – Topologia da proteína desacopladora 2 (UCP-2) presente o tecido adiposo marrom. Os desacopladores são assim chamados porque desacoplam a cadeia transportadora de elétrons da fosforilação oxidativa. Os desacopladores desviam a energia que seria usada para síntese de ATP convertendo-a em calor.

O APARATO ANTIOXIDANTE CELULAR

O advento do oxigênio na síntese de ATP trouxe o risco de formação contínua de radicais livres o que impulsionou as células a desenvolver múltiplos mecanismos de defesa antioxidante no sentido de prevenir danos à integridade celular⁶. Os mecanismos de defesa celular contra ERO's são: as enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase. Além das enzimas antioxidantes substâncias oriundas da dieta (tocoferóis, licopeno, flavonóides e ácido ascórbico, por exemplo) com propriedades antioxidantes também são utilizadas pela célula com o propósito de deter a cadeia oxidativa inicializada por radicais livres. Outra forma de proteção celular contra danos oxidativos é a compartimentalização, ou seja, a separação de locais de formação de espécies reativas de oxigênio do resto

da célula. De fato, a localização de enzimas antioxidantes tem relação com o tipo, o local e a quantidade de EROS formada em cada compartimento subcelular.

Por exemplo, enzimas responsáveis pela síntese de peróxido de hidrogênio estão confinadas nos peroxissomas onde a concentração de enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) é extremamente alta. Já as mitocôndrias dispõem de grandes quantidades de superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e GSH. No entanto, as maiores quantidades de enzimas antioxidantes são encontradas no fígado, nos rins e nas adrenais, já que nesses órgãos o conteúdo mitocondrial é extremamente alto. Outra forma de compartimentalização envolve o sequestro de ferro por proteínas intra e extracelulares (ferritina e hemossiderina). Ligado à proteínas, o ferro é incapaz de participar da reação de Fenton. Finalmente podemos definir

um antioxidante como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada às concentrações do substrato oxidável, impede a oxidação desse substrato de forma eficaz⁵⁶. Os antioxidantes podem ser classificados também quanto a sua localização em endógenos e exógenos, sendo que os primeiros estão presentes naturalmente no interior das células enquanto que os exógenos devem ser obtidos por meio da dieta, por exemplo. Outra forma de classificação dos antioxidantes é quanto a sua polaridade, uma vez que as espécies químicas reativas podem surgir tanto em meio hidrofílico quanto hidrofóbico. Os antioxidantes endógenos mais eficientes são as enzimas antioxidantes.

ANTIOXIDANTES DE NATUREZA ENZIMÁTICA

As enzimas antioxidantes constituem uma importante linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio formadas no ambiente intracelular e também contra os produtos celulares decorrentes das reações em cadeia desencadeadas por radicais livres. A SOD é uma enzima tetramérica manganês-dependente por apresentar um átomo deste mineral por subunidade. A SOD citosólica é uma enzima com duas subunidades, cada uma contendo um átomo de cobre e um átomo de zinco⁵⁷. Nos fluidos extracelulares a SOD também é zinco ou cobre dependente, é uma enzima tetramérica também apresentando quatro átomos de cobre e quatro de zinco em cada molécula. É secretada pelas células endoteliais. A superóxido dismutase é a enzima mais abundante no organismo humano e a quinta proteína no mesmo, mostrando desta maneira a sua importância bioquímica⁵⁷.

No entanto, a ação da SOD não promove uma dismutação completa do

radical superóxido uma vez que surge ao final da reação o peróxido de hidrogênio que, embora não seja um radical livre *per se* pode reagir com metais de transição como, por exemplo, o ferro ou cobre para formar um radical poderoso, o radical hidroxil (OH^{*}). Essa reação é conhecida como reação de Fenton. A reação iniciada pela SOD é completada pela catalase, uma hemoproteína contendo quatro grupos heme, dependente de ferro, encontrada predominantemente nos peroxissomos. A catalase converte o peróxido de hidrogênio (inorgânico) em água e oxigênio, apresenta o ferro como seu principal cofator. Ela é mais importante em condições onde há uma grande concentração de formação H₂O₂ como, por exemplo, os peroxissomas, fígado e eritrócitos^{5, 57}. Embora o peróxido de hidrogênio *per se* não seja tóxico, ele pode atuar como precursor de ânions hidroxil nas reações de Fenton e Haber-Weiss. O peróxido de hidrogênio é lipossolúvel de modo que, pode se difundir através das membranas biológicas e gerar hidroxil em locais onde o ferro ou o cobre estão presentes em abundância como, por exemplo, as mitocôndrias. É por essa razão que a degradação do peróxido de hidrogênio à água por parte da catalase é um passo importante na prevenção de danos oxidativos. Outra enzima antioxidante extremamente importante é a glutathione peroxidase (GPX), um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina com um grupamento amino de cisteína unido por uma ligação peptídica ao grupo γ -carboxila do glutamato⁵⁸. A GPX pertencente a uma família de enzimas de selênio, estão presentes nas células tanto no citosol quanto nas mitocôndrias e são o principal mecanismo de remoção de H₂O₂⁵⁸, uma vez que promove dismutação mais completa do peróxido de hidrogênio em decorrência de ser gerada apenas água e também é

capaz de reduzir peróxidos orgânicos (R-OOH) (Tabela 2).

Tabela 2 – Reações envolvendo dismutação de radicais livres e enzimas relacionadas.

Reação	Comentários pertinentes
$\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	Dismutação do ânion superóxido por meio da enzima superóxido dismutase (SOD), uma enzima extremamente abundante no organismo humano.
$\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{+3} \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$	A reação de Fenton é aquela que dá origem ao radical hidroxil (OH [•]) quando o peróxido de hidrogênio reage com o íon ferro bivalente. Isso ocorre em função da incapacidade da SOD de promover uma completa dismutação do radical superóxido surgindo ao final da reação o peróxido de hidrogênio.
$\text{OH}^\bullet + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Fe}^{+3} / \text{Cu}^{+2}} \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$	A dismutação do ânion peroxil é realizada pela catalase. Dessa forma a catalase conclui a reação inicializada pela SOD convertendo o peróxido de hidrogênio (inorgânico) em água e oxigênio.
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$	O ânion superóxido pode reagir diretamente com o peróxido de hidrogênio dando origem ao íon hidróxido e ao radical hidroxil. Esse evento é denominado reação de Haber-Weiss e ocorre numa única etapa, e não requer ferro.

A GPX é uma enzima tetramérica com um átomo de selênio por subunidade e existe em diversas isoformas as quais são específicas para atuar em meios hidrofílicos ou hidrofóbicos⁵. Nas reações catalisadas pela GPX os grupos sulfidril reagem de modo a promover a redução do peróxido de hidrogênio à água e dos peróxidos lipídicos à alcóis atóxicos. Essas reações envolvem a oxidação de duas moléculas de glutathione que dão origem a uma única molécula de glutathione dissulfeto sendo que os grupos sulfidril também são oxidados

com radicais orgânicos em reações não enzimáticas de terminação de reações em cadeia⁵⁸. Uma vez formada a glutathione oxidada (GSSG), sua recuperação é realizada pela glutathione redutase (GSR), enzima presente nas mitocôndrias a qual irá utilizar via de Warburg-Lipman-Hoercker, para gerar poder redutor, ou seja, NADPH + H⁺⁵⁷. O magnésio também participa da regeneração da glutathione reduzida, pois é um cofator de enzimas do ciclo das pentoses (NADPH). A razão [GSH] / [GSSG] é 10:1 (Figura 8).

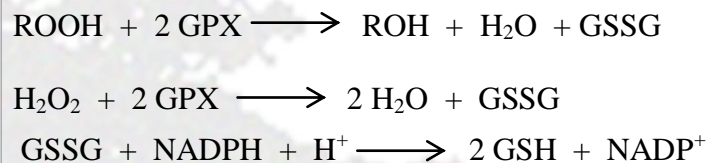


Figura 8 - Reações mediadas pela glutathiona peroxidase (GPx) uma enzima tetramérica dependente de selênio. Catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2) pela glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada e água (ou álcoois). Para a GPx continuar a catalisar esta reação, a glutathiona oxidada necessita ser novamente reduzida (pela glutathiona redutase) para novamente servir de substrato, sendo que para essa redução ela irá utilizar a NADPH formada pela via das pentoses.

A atividade da GPX encontra-se dois terços no citoplasma e um terço na mitocôndria. O selênio é seu cofator, e além de potencializar sua atividade, ele tem um efeito sinérgico com o α -tocoferol, aumentando a inibição da peroxidação lipídica. Reações envolvendo metais que podem gerar espécies químicas reativas são inibidas pelas metalotioneínas. As metalotioneínas são proteínas que contém 60 a 68 resíduos de aminoácidos, dos quais 20 são cisteínas. Todos os 7 átomos de zinco presentes na proteína, estão ligados nestas moléculas de cisteínas, distribuídos em 2 domínios da proteína.

De fato, o zinco (Zn) difere dos outros metais de transição, pois contém a camada eletrônica "d" completa e assim não participa de reações redox, mas age como ácido de Lewis para aceitar um par de elétrons, fazendo com que seja um íon estável. O zinco ocorre naturalmente como 5 isótopos estáveis: ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn , e ^{70}Zn . Geralmente se complexa com aminoácidos, peptídios e nucleotídeos e tem afinidade com grupos tióis e hidrogênio⁵⁹. Essas pequenas proteínas

reagem, portanto, com metais em transição, impedindo-os de catalisar a reação de Haber-Weiss e a reação de Fenton, o que levaria a geração do radical hidroxil (OH^\bullet). Uma vez que a mitocôndria é uma fonte de radicais livres, o que pode ser confirmado ao avaliar-se as operações da fosforilação oxidativa, as células contam com a coenzima Q (ubiquinol) que está presente na própria cadeia transportadora de elétrons conduzindo elétrons aos pares através dos complexos da cadeia respiratória perfazendo assim, o denominado ciclo Q.

Sua principal função é atuar como componente redox dos sistemas de transporte de elétrons transmembrana, como na cadeia respiratória mitocondrial. A coenzima Q existe em 3 formas: QH_2 , Q e Q^- , sendo as duas primeiras solúveis (movem-se pela membrana) e a semiquinona (Q^-) não lipossolúvel fica presa, próximo à fase aquosa da matriz. Dessa forma, a coenzima Q cumpre uma função ambígua, ao mesmo tempo em que é um eficiente *scavenger* (varredor), sobretudo em fases lipídicas pode

também ser responsável pela geração de superóxidos⁵⁷(Figura 9).

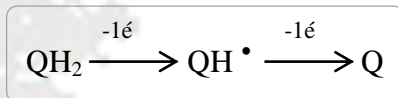


Figura 9 – Ubiquinol, carreador de elétrons por meio do ambiente hidrofóbico da bicamada lipídica atua como *scavenger* e gerador de ânions superóxidos.

ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

Uma definição possível de antioxidante é que são substâncias capazes de inibir a oxidação de outras substâncias ou ainda uma dada substância que em concentrações baixas quando comparadas às concentrações do substrato oxidante apresentam a propriedade de impedir a oxidação de substâncias susceptíveis⁶⁰. Os antioxidantes não enzimáticos podem ter origem endógena ou dietética e atuam de modo a complementar a função do aparato antioxidante enzimático. De fato, o consumo de frutas e vegetais está associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças relacionadas à radicais livres⁵⁷. Esses antioxidantes podem agir diretamente neutralizando a ação das espécies radicalares ou de forma indireta atuando em sistemas enzimáticos com propriedade antioxidante⁶⁰. Dentre os antioxidantes de origem dietética destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e carotenóides (precursores da vitamina A)⁶¹. Outros carotenoides que não são precursores da vitamina A tais como, luteína, licopeno e zeaxantina também tem função antioxidante. Os minerais também podem exercer função antioxidante e dentre esses destacam-se o zinco, cobre, selênio e magnésio⁶². Diversos autores defendem que os compostos antioxidantes da dieta são

mais efetivos quando atuam em sinergia de modo que, a avaliação de uma propriedade antioxidante de um nutriente isolado não mostra sua plena capacidade de proteção contra danos oxidativos. De fato, as vitaminas C e E atuam de forma cooperativa na inibição da cascata oxidativa que conduz a peroxidação de lipídeos e danos no DNA⁶¹. Além disso, a determinação *in vivo* do potencial antioxidante dos compostos não enzimáticos está condicionada a diversas variáveis tais como: a) absorção e biodisponibilidade em situações fisiológicas; b) concentração plasmática ideal da substância antioxidante para que a atividade antioxidante seja exercida; c) tipos de espécies radicalares geradas no processo oxidativo assim como em quais compartimentos celulares essas espécies radicalares foram geradas e de que forma foram geradas⁶¹.

Alguns antioxidantes podem atuar de forma inversa ao esperado, ou seja, podem exercer função oxidativa, isso ocorre com a vitamina C quando entra em contato com metais de transição, particularmente o ferro. Nessa circunstância, a vitamina C tende a aumentar a absorção de ferro tornando-o mais apto para atuar nas reações de Fenton⁶². Os antioxidantes não enzimáticos são mais ou menos efetivos de acordo com a polaridade de cada compartimento celular ou tecido onde atuam, por exemplo, a vitamina C é bastante eficiente em debelar

espécies radicalares geradas em ambientes hidrofílicos sendo ineficiente na prevenção de peroxidação de lípidos que ocorrem em meios hidrofóbicos (Tabela 3). Em

contrapartida, os flavonoides tem a propriedade de agir em ambos os meios, tanto hidrofílico quanto hidrofóbico⁶¹

Tabela 3 – Mecanismos de ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

	Antioxidante	Caráter	Mecanismo de ação
Antioxidantes enzimáticos	Superóxido dismutase (SOD)	Hidrofílico	Dismutação do O_2^- em H_2O_2 e O_2
	Catalase	Hidrofílico	Dismutação da H_2O_2 em H_2O e O_2
	Glutathiona peroxidase (GPX)	Hidrofílico ou lipofílico	Redução do R-OOH em R-OH
	Glutathiona redutase	Hidrofílico	Redução do R-S-S-R a R-SH <i>scavenger</i> de radicais livres, cofator da GPX.
Antioxidantes oriundos da dieta	Ácido ascórbico (vitamina C)	Hidrofílico	<i>Scavenger</i> de radicais livres, regenera os tocoferóis (vitamina E), mantém enzimas em estado reduzido.
	Retinóis e carotenóides	Lipofílico	<i>Sacvenger</i> de radicais livres.
	Tocoferóis (vitamina E)	Lipofílico	Previne lipoperoxidação e aumenta a absorção do selênio.
	Selênio	Anfifílico	Constituinte da GPX e da tioredoxina
Outros	Metalotioneínas	Hidrofílico	Liga-se a metais de transição promovendo sua neutralização
	Thioredoxinas	Hidrofílico	Redução do R-S-S-R a R-SH
	Ubiquinol	Lipofílica	<i>Scavenger</i> de radicais livres, previne a lipoperoxidação.
	Ácido lipóico	Anfifílico	<i>Scavenger</i> de ERO's

CONCLUSÕES

Nos últimos anos diversos esforços tem sido direcionados no sentido de melhor compreender o papel dos radicais livres nos organismos, sobretudo no organismo humano. De fato, uma gama de doenças têm os radicais livres como seus precursores, como por exemplo, aterosclerose e o Alzheimer. Até mesmo processos tão inerentes à natureza humana como o

envelhecimento têm suas bases na oxidação desencadeada por radicais livres. Assim sendo o estresse oxidativo parece ser um processo irreversível e inexorável que, pode em algumas circunstâncias, ser reduzido, lentificado, porém não totalmente eliminado. Lentamente os radicais livres conduzem a alterações biológicas que como numa reação em cadeia culminam levando o organismo todo a um colapso. Sem uma alternativa ao oxigênio seguimos

respirando e por cerca de 75 a 80 anos. Nesse período o oxigênio já desencadeou danos irreparáveis e, chamamos esse período de “expectativa de vida”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS. Mitochondria and Reactive Oxygen Species. *Hypertension*. 2009; 53(6): 885–892.
2. Srinivasan S, Avadhani NG - Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53(6):1252-1263.
3. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992; 59: 609-623.
4. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43(1): 61-68.
5. Olivier S - Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biologies*. 2004; 327: 649–662.
6. Sies, H. Strategies of antioxidant defence. *Review. Euro-pean Journal of Biochemistry*. 1993; 215: 213-219.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
8. Harman D. Aging: overview- *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 928:1-21.
9. Blanchard JL, Lynch M. "Organelar genes: why do they end up in the nucleus?", *Trends in Genetics*. 2000: 16 (7); 315-320.
10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 2002.
11. Bernhard Kadenbach. - Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1604; 77– 94.
12. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1989; 86: 5159–5162.
13. Kilo S, Berghoff M, Hilz M, Freeman R. Neural and endothelial control of the microcirculation in diabetic peripheral neuropathy. *Neurology*. 2000; 54 (6): 1246-1252.
14. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan j, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs*. 2005; 21(1):24-8.
15. Droge, W. Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*. 2002; 82: 47–95.
16. Lambeth, JD. NOX enzymes and the biology of oxygen. *Nat. Rev. Immunol*. 2004; 4: 181–189.
17. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005; 120(4):483-95.
18. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation-reduction state. *Biochem*. 2002; 368: 545–553.
19. Chen Q, Vazquez, EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 36027–36031.
20. Wood PM. The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem. J*. 1988; 253: 287–289.
21. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 222–230.
22. Loschen G, Flohe L, Chance B. Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett*. 1971; 18; 261–264.
23. Staniek K, Nohl H. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen

species? *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1460: 268–275.

24. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand M.D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 44784–44790.

25. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 1973; 134: 707–716.

26. PROFERT, 2003 Profert (2003). Disponível (on-line) <http://www.profert.com.br/diagnost061.htm> (20 de abril).

27. Addabbo F, Montagmani M, Goligorski MS. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension.* 2009; 53(6):885-892.

28. Zhang L, Yu L, Yu CA. Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273:33972–33976.

29. Cadenas E, Boveris A, Ragan C I, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 1977; 180: 248–257.

30. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47:143–183.

31. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328:85–92.

32. Gao S, Chen J, Brodsky SV, Huang H, Adler S, Lee JH, Dhadwal N, Cohen-Gould L, Gross SS, Goligorsky MS. Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial

outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria. *J Biol Chem* 2004;279:15968–15974.

33. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:7631–7636.

34. Sano M, Fukuda K. Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis. *Circ Res* 2008;103:1191–1193.35. Xiao FS, Fu ZW, Shi QX, Yan NQ, Yu SL, Hong MY, Qing SZ, Shan WF, Xi RG, Jian GX, Jie Y. A cardiolipina é o alvo da cardiotoxicidade dos anestésicos locais? *Rev. Bras. Anestesiologia.* 2010; (60) 4.

36. Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene.* 2006; 25:4683–4696.

37. Sazanov, L. A. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry.* 2007; 46: 2275–2288.

38. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004; 279(47): 49064-73.

39. Missirlis F, Hu J, Kirby K, Hilliker AJ, Rouault TA, Phillips JP. Compartment-specific protection of iron-sulfur proteins by superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2003; (278): 47365– 47369.

40. Barja, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2003; 31:347–366.

41. Hinkle PC, Butow RA, Racker E, Chance B. Partial resolution of the

enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome β region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *J Biol Chem.* 1967; 242: 5169–5173.

42. Hirst J, King M S, Pryde K R. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans.* 2008; 36: 976–980.

43. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103: 7607–7612.

44. Votyakova TV, Reynolds IJ. ψ m-Dependent and ψ -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem.* 2001; 79: 266–277.

45. Seo BB, Marella M, Yagi T, Matsuno-Yagi A. The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I. *FEBS Lett.* 2006; 580: 6105–6108.

46. Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006; 27: 639-645.

47. Murphy, MP. How mitochondria produces reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009; 41: 1-13.

48. Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.* 2004; 279: 39414–39420.

49. Crofts AR, Holland JT, Victoria D, Kolling DR, Dikanov SA, Gilbreth R, Lhee S, Kuras R, Kuras MG. The Q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc1 complex account for the function of a dimeric complex? *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1777: 1001-19.

50. Nicholls DG, Ferguson, SJ. *Bioenergetics* 3, p. 128, Academic Press, London, 2002.

51. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci.* 2004; 36:7779-7788.

52. Tadashi kitahara A, Ha-Sheng Li A, Carey D, Balaban ABC. Localization of the mitochondrial uncoupling protein family in the rat inner ear. *Hearing Research* 2004; 196: 39–48.

53. Boschini RP, Garcia Júnior JR. Regulação da expressão gênica das UCP2 e UCP3 pela restrição energética, jejum e exercício físico. *Rev Nutr.* 2005; 18:753-764.

54. ERLANSON-ALBERTSON C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta. Physiol Scand.* 2003; 178: 405–412.

55. Porter RK, Mitochondrial proton leak: a role for uncoupling proteins 2 and 3? *Biochem Biophys Acta.* 2001; 1504: 120–127.

56. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.* 1999; 12: 123-130.

57. Efraim O. Tratado de medicina ortomolecular. 2^o edição-revisada e ampliada. Editora Nova Linha, 2000.

58. Marks DA, Lieberman M, Smith C. *Bioquímica Médica Básica de Marks- Uma abordagem Clínica.* Ed. Artmed, 2007.

59. Mafra, D & Cozzolino, SMF. Importância do zinco na nutrição humana. *Rev Nutr.* 2004; 17: 79-87.

60. Halliwell B, Whiteman M.- Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142:231-55.

61. Barbosa KBR, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito,

implicações e fatores modulatórios.
2010; 4: 629-643.

62. Bao B, Prasad AS, Beck FW, Snell D, Suneja A, Sarkar FH, Doshi N, Fitzgerald JT, Swerdlow P. Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Transl Res.* 2008;152:67-80.