

**JOSÉ ALBERTO FERNANDES GOMES DOS SANTOS**



**EXERCÍCIO FÍSICO, RADICAIS LIVRES, ESPECIES REATIVAS DE  
OXIGÊNIO, ENVELHECIMENTO E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

Monografia apresentada ao curso de Especialização Lato Sensus em Fisiologia do Exercício, Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Especialista em Fisiologia do Exercício. Orientador: Professor Ms. Vinícius Coneglian Santos.

**CURITIBA  
2013**

<b>RESUMO</b> .....	3
<b>1– INTRODUÇÃO</b> .....	4
<b>2 – REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	6
2.1 - RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	6
2.2 – RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO.....	8
2.3 - ENVELHECIMENTO.....	10
2.3.1–Fontes Não-mitocondriais de Espécies Reativas de O <sub>2</sub> e Nitrogênio.....	13
2.3.1.1 – Reação de Fenton.....	13
2.3.1.2 – Enzimas Microsossomais do citocromo P450.....	14
2.3.1.3 – Explosão respiratória de células fagocíticas.....	14
2.3.1.4 – $\beta$ -oxidação Peroxizomal.....	15
2.3.1.5 – Fontes exógenas de Espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio.....	15
2.4 – Dano Oxidativo no Envelhecimento.....	16
2.5 – Espécies reativas de O <sub>2</sub> como mediadores do envelhecimento celular.....	17
2.6 – Questões controversas sobre a hipótese oxidativa do envelhecimento.....	18
2.7 – DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	19
2.7.1 – Doença de Parkinson.....	20
2.7.2 – Doença de Alzheimer.....	22
2.7.3 – Esclerose Lateral Amiotrófica.....	24
2.7.4 – Doença de Huntigton.....	25
2.8 – SISTEMAS ANTIOXIDANTES.....	26
2.9 – MODULAÇÃO DO METABOLISMO REDOX ATRAVÉS DO EX. FÍSICO..	29
2.9.1 – Fontes Aeróbias Produtoras de ROS.....	29
2.9.2 – Fontes Anaeróbias Produtora de ROS.....	30
<b>3.0 CONCLUSÕES</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34

## RESUMO

Diversas adaptações metabólicas podem ser moduladas através do exercício físico sistematizado. Dentre essas adaptações moduláveis podemos citar o acúmulo de lesões celulares gerados por ROS, RNS e RL decorrentes, também, do processo natural de envelhecimento. Processo esse chamado de estresse oxidativo que está diretamente relacionado com o metabolismo oxidativo, o que não quer dizer necessariamente aeróbio. RL são moléculas que podem ou não possuir um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica conferindo, assim, certa reatividade a tal composto (ex.:  $\bullet\text{OH}$ ) enquanto ROS e RNS são considerados reativos porém não necessariamente possuem um elétron desemparelhado (ex.:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ). As doenças neurodegenerativas têm em comum a função mitocondrial prejudicada (importante sítio produtor de ROS), aumento de danos oxidativos, defeitos no sistema ubiquitina-proteassoma, presença anormal de proteínas agregadas e alterações no metabolismo do ferro. Todos estes fatores estão envolvidos em um ciclo repetitivo e que a ação de qualquer um destes fatores, pode iniciar a lesão do neurônio, que por sua vez, “recruta” os outros fatores, com o propósito de destruir a célula. Visto as distintas modulações metabólicas no metabolismo redox geradas pelo exercício físico, tanto em sua predominância aeróbia quando anaeróbia, fica evidenciado que as diversas modulações geradas podem tornar-se, até certo ponto, moduláveis auxiliando no controle do estresse oxidativo e alterações metabólicas geradas por doenças neurodegenerativas.

**Palavras Chave:** Exercício Físico; Envelhecimento; Metabolismo Redox; Espécies Reativas de Oxigênio; Espécies Reativas de Nitrogênio; Doenças Neurodegenerativas; Parkinson, Alzheimer; Huntington, Esclerose Lateral Amiotrófica.

## 1 – INTRODUÇÃO

O químico Linus Pauling, ganhador do prêmio Nobel de Química de 1954, por ter lançado as bases das ligações covalentes entre átomos, afirmou em seu livro *Vitamin C and the Common Cold*, em 1970, que tomar 1000 mg de vitamina C, diariamente reduziria a incidência de resfriados em 45% para a maioria das pessoas, fundamentando um novo campo da medicina: a ortomolecular. Ele dedicou-se ao estudo dos radicais livres, que seriam responsáveis pelo aparecimento de doenças e pelo envelhecimento do organismo (Augusto, 2006).

Denham Harman em 1956 foi um dos primeiros pesquisadores a descrever a associação entre a presença dos radicais livres (RL) e o envelhecimento celular, retratando que o fenômeno do envelhecimento é o resultado do acúmulo de danos teciduais provocados pelas reações dos Radicais Livres (espécies reativas de oxigênio - ROS) nos componentes celulares ao longo da vida, produzidas durante o metabolismo aeróbio normal e que, baixos níveis do metabolismo basal estariam associados a um aumento na expectativa de vida, ou seja, quanto maiores às taxas metabólicas ou a exposição a radiações externas, maior a formação de radicais livres, conseqüentemente maior decadência funcional que é observada no envelhecimento (Augusto, 2006; Teston ET AL, 2010; Harman, 1956)

Nas duas últimas décadas, as ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) têm sido diretamente correlacionadas a uma série de patologias degenerativas, bem como parecem ser a base molecular dos processos degenerativos funcionais de células, tecidos e órgãos associados ao envelhecimento (Wang ET AL, 2005) . Isso fez com que o interesse científico nestas espécies radicalares, no que diz respeito a processos fisiológicos e patológicos revolucionassem os conceitos clássicos das ciências biomédicas (Barros ET AL, 2006). Desta forma fazendo uma busca no banco de dados do Pubmed em 17 de outubro de 2012 vemos diferentes incidências dos termos: free radical (41.269 artigos), aging (251.480 artigos), neurodegenerative diseases (18.363 artigos) e associando estes três termos encontramos 567 artigos. Assim é denotada a diversidade de

interesse da literatura científica no que tange essa temática.

Para melhor compreensão deste assunto, faz-se necessário situarmos os conceitos separados e qual são suas implicações biológicas quando associados em pesquisas e intervenções em geral.

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

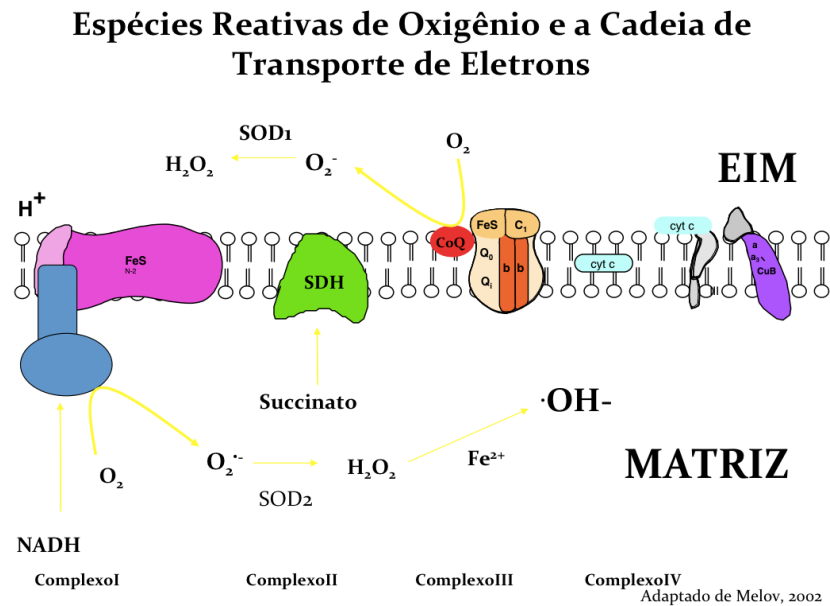
Entre as décadas de 1970 e 90 um conceito importante e coerente, embora impreciso surgiu, que é o de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Este termo foi criado porque os primeiros radicais livres (RL) e oxidantes caracterizados *in vivo* ou em sistemas enzimáticos dependiam do oxigênio molecular (a respiração mitocondrial, a oxidação de lipídios, o metabolismo de poluentes e medicamentos e a explosão respiratória dos fagócitos profissionais). Algumas espécies então conhecidas eram radicalares como o ânion superóxido, o radical hidroxila e os radicais alquila e peroxila. Outras não eram radicalares como o peróxido de hidrogênio, o ácido hipocloroso, o oxigênio singlete e peróxidos orgânicos. Por isso tem-se usado o termo “espécies reativas” ao invés de radicais livres (Augusto, 2006; Hirata ET AL, 2004).

Os RL podem ser formados pela perda de um único elétron (e-) ou pelo ganho de um e- de uma substância não radicalar. Podem também serem formados quando uma ligação covalente é quebrada e um e- de cada um dos pares permanece em cada átomo, processo chamado fissão homolítica. A energia necessária para dissociar a ligação covalente pode ser fornecida por termólise, radiólise, fotólise e reações de oxirredução. A grande maioria dos radicais livres possui como característica uma meia-vida muito curta, indo de minutos a nanossegundos, sendo capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como as membranas (Teston ET AL, 2010).

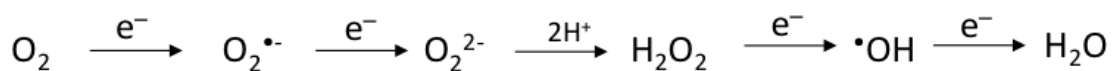
Um dos mecanismos básicos de formação de RL e ROS acontece na cadeia de transporte de elétrons (CTE), com a participação de dioxigênio (O<sub>2</sub>) e atividade na bomba de prótons (**Figura 1**).

Além da produção endógena, há também a produção exógena de RL. Como visto anteriormente, a principal fonte de RL endógena é a partir do metabolismo oxidativo normal durante o transporte de elétrons na mitocôndria (reação de redução completa do O<sub>2</sub>), onde a molécula de oxigênio é reduzida

pelo citocromo C oxidase à duas moléculas de água e o NADH é oxidado a NAD<sup>+</sup>, para que haja a produção de ATP, sendo que para a completa redução da molécula de oxigênio em duas moléculas de água, quatro elétrons são transportados dentro da membrana mitocondrial interna (**Figura 2**).



**Figura 1:** Formação do radical hidroxila na CTE. EIM: Espaço intermembranar. (Adaptado de Melov, 2002)



**Figura 2:** Redução do dióxigênio a água.

Ainda temos uma produção basal de RL e ROS. Por sua vez, a produção dessas substâncias pode encontrar-se aumentada por algum quadro patológico, ou por maior utilização da via glicolítica durante a prática de atividades e/ou exercícios físicos ou situações de estresse biológico em geral. Desta forma, temos a formação de um ânion, o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) que com a atividade da enzima SOD2, também representada como MnSOD, forma o  $\text{H}_2\text{O}_2$  que na

presença do  $\text{Fe}^{3+}$  reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  (reação de Fenton) gera o radical hidroxílica  $\bullet\text{OH}$ , considerado o mais lesivo à célula (Harper, 2003). O produto final dessas reações será a formação de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Melov, 2002). No entanto, de 1 a 2% dos elétrons escapam da mitocôndria e reagem com  $\text{O}_2$  não reduzido, formando como resultado da sucessiva transferência de elétrons isolados, ROS como superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radicais hidroxila ( $\text{OH}\bullet$ ) que são potencialmente tóxicos (Hirata ET AL, 2004).

Dentre os fatores exógenos de produção de RL temos a radiação ultravioleta (em especial o UVA que agride com mais intensidade a pele por fotossensibilização), pesticidas, poluição, tabaco, dieta, estresse, medicamentos antitumorais e estilo de vida não saudável 2, 5. Há também a formação do radical óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ), a partir da arginina, pela óxido nítrico sintetase (NOS) localizada na mitocôndria. Quando  $\bullet\text{NO}$  reage com  $\text{O}_2^\bullet$ , há a formação de outro radical, o peroxonitrito ( $\text{ONOO}^\bullet$ ).

## **2.2 – RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO**

Espécie Reativa de Nitrogênio (RNS) vem do processo de oxidação da L-arginina a L-citrulina e então formação do  $\text{NO}\bullet$ . Os RNS fazem parte de uma família de moléculas microbicidas derivadas do  $\text{NO}\bullet$ . Pode ser produzida por 3 diferentes enzimas denominadas óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS), óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). Sua produção ocorre em dois caminhos distintos. O primeiro envolve as NOS constitutivas (eNOS e nNOS), que são dependentes de complexos cálcio-calmodulina e tem sua produção de  $\bullet\text{NO}$  em concentrações mais baixas de forma que acaba servindo, também como mensageiro celular. Nessas condições o  $\bullet\text{NO}$  agirá preferencialmente em biomoléculas específicas como o grupo heme da guanilato ciclase, importante enzima desse processo (Wang ET AL, 2005). No segundo caminho a iNOS, independente de cálcio, tem participação na septicemia auxiliando na ativação de uma cascata de eventos que incluem a ativação de neutrófilos, monócitos e macrófagos além da produção de vários

fatores antiinflamatórios e grande síntese de NO•. A iNOS relacionada a condições inflamatórias tem sua atividade aumentada podendo quase zerar as quantidades de arginina (Aminoácido precursor do NO•) presentes no organismo (Yokoo ET AL, 2012). Quando ocorre aumento abrupto na produção de NO• em resposta a uma infecção, a pressão arterial do indivíduo pode baixar tanto, devido as suas propriedades vasodilatadoras, que pode levá-lo a falência múltipla dos órgãos e morte (Augusto, 2006).

Enquanto o NO• produzido por eNOS e nNOS tem como principal papel a sinalização em biomoléculas, o NO• sintetizado pela iNOS tem seu papel central nas resposta imunes e a exacerbação de sua expressão pode resultar no ataque aos tecidos saudáveis próximos ao local da infecção (Wang ET AL, 2005). Dessa forma, atingi-se um estado agudo ou até mesmo crônico da inflamação. A partir do momento que a expressão de iNOS é regulada por citocinas pró-inflamatórias, as inflamações no Sistema Nervoso Central (SNC), podem aumentar as quantidades de •NO por um longo período de tempo possibilitando uma ameaça irreversível a saúde e aos neurônios pós-mitóticos (Abbas ET AL, 2008).

O acúmulo excessivo de •NO através da nNOS e iNOS pode gerar de imediato reações com o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) ou outras ROS para a produção de RNS como o dinitrogenio trióxido (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), peroxonitrito (ONOO<sup>-</sup>), ácido peroxonitroso (ONOOH), ions nitroxil (NO<sup>-</sup>) e ions nitrosos (NO<sup>+</sup>). O acúmulo de algumas dessas substâncias como ONNO-/ONOOH podem induzir tanto nitração quanto nitrozilação de proteínas e oxidação de lipídios de membrana, o que contribui para a apoptose neuronal, perda de função mitocondrial causando déficit energético e degradação de DNA nuclear. O aumento na concentração de iNOS, proteínas nitrosiladas e lipídios peroxidados justapõem o envelhecimento e lesões neurodegenerativas com doença de Alzheimer, inflamações, encefalomielite auto-imune, isquemia, choques traumáticos, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doenças desmielinizantes, Parkinson, entre outros males (Wang ET AL, 2005).

Curiosamente, eNOS contribui com a iNOS em alguns eventos tóxicos para

o SNC e superprodução de  $\text{NO}\cdot$  acarretando em algum dos males supracitados, por ter sua atividade reduzida de forma a gerar hipertensão e espasmos no endotélio acarretando em um déficit no fornecimento de nutrientes e energia para o cérebro e neurônios. Conseqüentemente gera-se um desequilíbrio no estado redox. Para controle dessas situações, tem-se sugerido tratamento com reguladores negativos de iNOS e positivos de eNOS. Alguns desses mecanismos objetivam formas miméticas de SOD na idéia de dissipar rapidamente a formação de superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e prevenir a formação de peroxonitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que se apresenta como um dos RNS de maior efeito deletério no SNC. O  $\text{ONOO}^-$  pode gerar hipertensão ao atenuar a atividade da eNOS, induzir apoptose através da via intrínseca, e transmitir o estresse oxidativo de forma global em todo o cérebro (Halliwell, 2007).

Como tratamos inicialmente de lesões a nível de membrana celular e proteínas enzimáticas, é possível observar o acúmulo dessas lesões no decorrer do tempo. Portanto, tornam-se mais incidentes problemas degenerativos decorrentes de RNS, ROS e RL com o passar dos anos (Mattei, 2011).

### **2.3 – ENVELHECIMENTO**

Envelhecimento é um processo extremamente complexo, multifatorial e representa a deterioração gradual em funções que ocorrem após a maturidade e levam à inabilidade ou morte (Florez-Duquet, 1998 ; Gilca 2007).

A perspectiva mais ampla inclui todos os processos biológicos que ocorrem dentro do organismo desde o início da vida (fertilização) até a morte, como eventos seqüenciais e coordenados que constituem o desenvolvimento dos organismos envolvendo o controle genético e inclui uma gama de teorias chamadas de genético-desenvolvimentista destacando-se as Teoria da Velocidade de Vida, Teoria do Envelhecimento Celular, Teoria dos Telômeros e a Teoria Imunológica (Teston, 2010; Florez-Duquet, 1998; Gilca 2007).

Uma definição mais recente e precisa identifica o envelhecimento como a incapacidade do organismo para responder ao estresse e manter a regulação

homeostática frente a um dado desafio, diminuindo assim a capacidade do organismo para sobreviver às mudanças prejudiciais que ocorrem com o tempo durante a vida após a maturidade, inclui as teorias chamadas estocástica, destacando-se as Teoria das Mutações Somáticas, Teoria do Erro-catástrofe, Teoria da Reparação do DNA, Teoria da Glicosilação e a Teoria do Estresse Oxidativo que admitem como hipótese que o processo de envelhecimento dependeria, principalmente, do acúmulo de agressões extrínsecas (Teston, 2010; Florez-Duquet, 1998; Gilca 2007).

Esta teoria do envelhecimento ligada aos radicais livres proposta por Harman vem sendo refinada com passar dos anos inclusive com a inclusão de espécies reativas de oxigênio na teoria. Em 1972 Harman identificou a mitocôndria como uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio e o principal alvo de seus efeitos deletérios, identificando assim a mitocôndria como um relógio biológico (Harman 1972; Alexeyev, 2009).

A teoria mais estudada e mais aceita para o envelhecimento e que tem sobrevivido ao crivo do tempo, portanto é a Teoria dos Radicais Livres juntamente com a teoria mitocondrial. Tais teorias afirmam que o estresse oxidativo na mitocôndria pode levar a um ciclo vicioso no qual o dano mitocondrial produz quantidades elevadas de espécies reativas de oxigênio, levando a um aumento progressivo da lesão (Teston, 2010, Alexeyev, 2009; Alves 2005; Romano 2010).

Existem dois tipos principais de fontes endógenas de oxidantes (RL e ROS e RNS): Fontes mitocondriais (que desempenham o papel principal no envelhecimento) e fontes não-mitocondriais (que desempenham papéis diferentes e por vezes específicos, especialmente na patogênese de doenças relacionadas à idade) (Teston, 2010; Hirata, 2004; Alexeyev, 2009).

De fato, a principal fonte de radical livre endógena é a partir do metabolismo oxidativo normal durante o transporte de elétrons na mitocôndria (reação de redução completa do O<sub>2</sub>), onde a molécula de oxigênio é reduzida pelo citocromo C oxidase à duas moléculas de água e o NADH é oxidado a NAD<sup>+</sup>, para que haja a produção de ATP, sendo que para a completa redução da

molécula de oxigênio em duas moléculas de água, quatro elétrons são transportados dentro da membrana mitocondrial interna. (Teston, 2010; Alexeyev, 2009).

As mitocôndrias possuem a enzima superóxido dimutase (mSOD) que rapidamente varre o  $O_2^{\cdot-}$ . Alguns pesquisadores (Halliwell et al, 2007) acreditam que mSOD evita o acúmulo de  $O_2^{\cdot-}$ , enquanto outros argumentam que mSOD aumenta a taxa de geração de  $O_2^{\cdot-}$ , acelerando a remoção deste radical por dismutação de  $H_2O_2$ . Sabe-se no entanto, que 1 a 2% dos elétrons escapam da mitocôndria e reagem com  $O_2$  não reduzido, formando como resultado da sucessiva transferência de elétrons isolados, espécies reativas de oxigênio. Mitocôndrias disfuncionais se acumulam durante o envelhecimento devido ao dano oxidativo mitocondrial de macromoléculas. O papel do dano oxidativo mitocondrial no envelhecimento e na doença de Alzheimer tem implicações importantes para terapêutica: a terapia antioxidante mitocondrial foi encontrada ser um dos métodos mais eficazes na redução de alterações patológicas no tecido cerebral em estudos sobre doença de Alzheimer em modelo animal (Teston, 2010; Hirata, 2004; Alexeyev, 2009).

A teoria do envelhecimento mitocondrial prevê que a proximidade do DNA mitocondrial (mtDNA) com a maior fonte celular de radicais livres o torna muito suscetível aos insultos oxidativos e, assim, aumenta a taxa de mutações do mtDNA, levando a um agravamento da disfunção da respiração aeróbica (mtDNA codifica as proteínas da cadeia respiratória). A conseqüente diminuição da transferência de elétrons leva à produção adicional de ROS, estabelecendo assim um círculo vicioso do estresse oxidativo e declínio energético, que é suspeito ser um das principais causas do envelhecimento (Hirata, 2004; Alexeyev, 2009).

As deficiências mitocondriais levam também à ativação de genes nucleares. Esta via de sinalização da mitocôndria para o núcleo, chamado de resposta retrógrada, parece influenciar a divisão celular, resistência ao estresse e, eventualmente, a taxa de envelhecimento e longevidade, pelo menos em modelos de fungos (Hirata, 2004; Alexeyev, 2009). A restrição calórica leva à

diminuição da produção de ROS mitocondrial e, portanto, a uma redução do estresse oxidativo mitocondrial, que pode ser responsável por um aumento na longevidade (Alexeyev, 2009).

No entanto, a maioria dos dados disponíveis que apóiam a teoria mitocondrial do envelhecimento são meramente correlatos e, portanto, não excluem a possibilidade de que a produção de ROS e mutações do mtDNA são causas e não as forças motrizes do envelhecimento. Além disso, há evidências controversas recentes que mutações mitocondriais não limitam o tempo de vida de camundongos selvagens, mutações pontuais específicas não podem se acumular com o envelhecimento na região controle do DNA mitocondrial do camundongo e a produção mitocondrial de ROS pode não ser afetada em camundongos com mtDNA mutante exibindo o envelhecimento fenótipo (Alexeyev, 2009).

### **2.3.1 – Fontes Não-mitocondriais de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio**

#### **2.3.1.1 – Reação de Fenton**

O  $H_2O_2$  degradado na reação de Fenton (Fig. 3) é catalisado por íons de ferro livre bivalente levando à geração radical hidroxila. Estudos recentes localizaram a  $\bullet OH$  reação Fenton no retículo endoplasmático ou perinuclear, mas não em mitocôndrias ou outros compartimentos. As fontes de  $H_2O_2$  podem ser a mitocôndria (reação de superóxido dismutase), peroxissomos (reação de oxidação da acetil-CoA) e b-amilóide de placas senis (superóxido dismutase-como reações). O  $H_2O_2$  que escapa dos mecanismos antioxidantes, como a glutathione peroxidase e catalase, podem ser convertidos não enzimaticamente em uma reação Fenton localizada perinuclear e agir como um agente prejudicial ao RNA ou DNA. Conforme descrito por Halliwell ET AL (2007) foi demonstrado que a reação Fenton está envolvida na oxidação de RNA ribossomal no cérebro em tecidos obtidos de necropsias de casos confirmados da doença de Alzheimer. Portanto, a reação de Fenton pode desempenhar um papel especial no contexto

do envelhecimento, tendo também em conta que o conteúdo do corpo de ferro aumenta com a idade (Alexeyev, 2009; Cui, 2011).

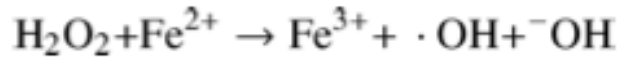


Figura 3: Reação de Fenton.

### 2.3.1.2 – Enzimas Microssomais do citocromo P450

Microssomas contêm as enzimas do citocromo P450, que catalisam a oxidação univalente ou redução de compostos xenobióticos (por exemplo, drogas); simultaneamente é gerada. Estudos diretos da capacidade de  $\text{O}_2^-$  metabolismo de drogas em humanos idosos são escassos. No entanto, vários estudos tem concluído que o envelhecimento provoca um declínio na concentração de monoxigenases cyt P450 em animais senescentes, enquanto a restrição calórica, que tem um conhecido efeito de prolongar a vida útil, aumenta a expressão de diferentes proteínas da família citocromos P450. A maior autoregulação genica entre os 20,000 genes analisados antes e depois de 24 e 48h de inanição, é citocromo P450 4A14 (Cyp4a14). Além da produção secundária de  $\text{O}_2^-$ , Os membros da família cyt P450 estão envolvidas na resistência ao estresse oxidativo, aumentando assim a longevidade (Alexeyev, 2009; Cui, 2011).

O declínio, induzido pela idade, das enzimas P450 cyt poderia contribuir para a alta incidência de reações adversas e toxicidades às drogas relatadas em pessoas mais velhas, bem como diminuição da proteção antioxidante, mas não pode explicar uma maior produção de ROS durante o envelhecimento (Alexeyev, 2009)<sup>15</sup>.

### 2.3.1.3 – Explosão respiratória de células fagocíticas

A explosão respiratória de células fagocíticas é uma fonte de  $\text{O}_2^-$  via a reação NADPH oxidase durante condições inflamatórias ou infecciosas. De acordo com a teoria da senescência prematura induzida pelo estresse (SIPS),

doses sub-letais de diferentes agentes estressores ( $H_2O_2$ , hiperóxido, radiação UV) levam ao esgotamento do potencial de replicação das células proliferativas normais e ao acúmulo de células senescentes, que pode ser responsável pela criação de um estado micro-inflamatório e pela ativação de células fagocíticas, participando assim no envelhecimento dos tecidos. Alexeyev (2009) mostrou que, em idosos saudáveis, o estado pró-inflamatório é elevado .

Um Jejum curto (80h) em seres humanos saudáveis levou a uma diminuição do índice de estimulação de leucócitos ativados com opsoninas, fitohemaglutinina P e concanavalina A. Estudos recentes em animais também mostraram que jejuns curtos repetidos são eficazes no prolongamento da vida útil ou protegem contra doenças relacionadas à idade (Augusto, 2006) É uma suposição razoável de que o efeito anti-envelhecimento de jejum intermitente pode ser também devido à reversão do estado pró-inflamatório relacionado com a idade (Alexeyev, 2009; Cui, 2011).

#### **2.3.1.4 – $\beta$ -oxidação Peroxizomal**

A  $\beta$ -oxidação Peroxizomal dos ácidos graxos gera  $H_2O_2$ . Os peroxissomos também contêm catalase que decompõe  $H_2O_2$  e, assim, evita acúmulo local deste composto tóxico. Como as células envelhecem, a capacidade dos peroxissomos para manter esse equilíbrio entre peroxissomos pró-oxidantes e antioxidantes está gradualmente comprometida. (Alexeyev, 2009; Cui, 2011).

Os proliferadores Peroxisomais, que aumentam o número de peroxissomos e a atividade de enzimas envolvidas na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, também causam danos oxidativos (Alexeyev, 2009).

#### **2.3.1.5 – Fontes exógenas de Espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio**

Além das fontes endógenas, várias fontes exógenas estão envolvidas na produção de ROS como diferentes estímulos ambientais, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, radiações ionizantes, luz ultravioleta, oxidantes químicos, quimioterápicos, hiperoxia, toxinas e metais de transição. Dentre as várias fontes exógenas de RL, o fotoenvelhecimento é a mais importante causa do

envelhecimento, especialmente pela luz ultravioleta, que produz radicais livres. A pele também pode sofrer mudanças oxidativas induzidas por danos físicos como queimaduras e ferimentos. As radiações ultravioleta A e B são componentes essenciais da luz solar que geram severo estresse oxidativo nas células cutâneas via interação com cromóforos intracelulares e fotossensibilizadores, resultando em danos genéticos transitórios e permanentes e na ativação de atalhos de sinais citoplasmáticos de transdução relacionados ao crescimento, diferenciação, senescência replicativa e degradação do tecido conectivo. O fotossensibilizador excitado reage com o oxigênio, resultando na geração de ROS e oxigênio singlete ( $O_2^1$ ). Estes podem também ser produzidos por neutrófilos que estão em número aumentado na pele fotodanificada e contribuem para o estado pró-oxidante geral

#### **2.4 – DANO OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO**

Todas as moléculas biologicamente ativas são susceptíveis a sofrer danos oxidativos e, portanto, falhar no cumprimento de suas funções nativas. Uma enorme diversidade de efeitos negativos resultam desta oxidação indiscriminada (Hirata, 2004; Alexeyev, 2009; Cui, 2011). Níveis elevados de lipídios oxidados, DNA, proteínas e glicosilação de macromoléculas são encontrados em organismos envelhecidos. O radical hidroxila oxida o DNA, levando à formação dos adutos 8-oxo-7, 8 dihidro-2'-desoxiguanosina (oxo 8dG) em suscetíveis 5-GC-3'. Estudos demonstram que frequência de adutos com DNA oxidado aumenta em até duas vezes com a idade em diferentes espécies e tecidos (Augusto, 2006).

O DNA mitocondrial é mais vulnerável a danos oxidativos do que o DNA nuclear, pois não é protegido por histonas e as mitocôndrias são os sítios primários da geração de ROS. Isto leva a mutações do DNA mitocondrial, envolvendo os genes que codificam proteínas da cadeia respiratória e também podem perturbar a divisão das mitocôndrias, resultando em sua ampliação. Mitocôndrias maiores são menos autofagocitadas (por lisossomos, que estão sobrecarregados com lipofuscina) e passam por mais danos oxidativos.

Resumidamente, a teoria do eixo-lisossomal mitocondrial do envelhecimento sustenta que a acumulação de mitocôndrias disfuncionais e lisossomos leva irreversivelmente à morte celular (Halliwell, 2007).

As proteínas isoladas de indivíduos envelhecidos exibem um maior teor de carbonila, que estima a extensão total da oxidação de proteínas (por exemplo, ceruloplasmina "velha" versus ceruloplasmina "jovem" contém 0.6mol versus 0,2 mol de carbonila/mol de proteína). Apesar dessas mudanças oxidativas induzidas pela idade, algumas proteínas não perdem a sua função biológica (por exemplo, a atividade da oxidase ceruloplasmina não é alterada em indivíduos mais velhos) (Alexeyev, 2009).

## **2.5 – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COMO MEDIADORES DO ENVELHECIMENTO CELULAR**

Espécies reativas de oxigênio também desempenham o papel de moléculas sinalizadoras em envelhecimento celular e no aumento da apoptose relacionado à idade induzida pela mitocôndria. No entanto, o mecanismo molecular de sinalização permanece obscuro (por exemplo, na sinalização do superóxido). Uma nova hipótese de sinalização com base na frequência, esquecendo as propriedades "super"-nucleofílica do ânion superóxido, foi proposta recentemente. Os radicais livres induzem alterações na expressão gênica (p53, HSP70, genes da família Bcl). Erros de regulação da cascata de sinalização também podem ser responsáveis pelo desenvolvimento do envelhecimento.

A Seladin-1, uma proteína cuja expressão é regulada na doença de Alzheimer, protege as células contra o estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio induzem a redistribuição de seladin-1 do citosol para o núcleo, onde fisicamente se liga a p53 e levando ao seu acúmulo, parada no G1 e senescência replicativa.

Outro mecanismo subjacente ao envelhecimento celular é o desgaste dos telômeros. Os telômeros estão localizados no final dos cromossomos e cada divisão está associada a uma diminuição no comprimento dos telômeros. Já está bem estabelecido que um nível elevado de estresse oxidativo encurta os

telômeros e desencadeia o envelhecimento.

## **2.6 – Questões controversas sobre a hipótese oxidativa do envelhecimento**

1. O envelhecimento "prematureo" sem hipersensibilidade ao estresse oxidativo: □A hipótese oxidativa da senescência não explica o envelhecimento "prematureo". Nem a hipersensibilidade ao estresse oxidativo acelerada nem a aguda foi detectada em fibroblastos primários ou culturas de eritroblastos a partir de vários modelos de camundongos progeróides, que estão associadas principalmente com a senescência de fibroblastos acelerada.

2. Ações gênicas alteram a resistência ao estresse oxidativo, mas não o tempo de vida: Manipulações genéticas que aumentam a atividade de CuZn, SOD e, assim, a resistência ao estresse oxidativo, têm apenas um efeito, se houver, no máximo de ligeiro aumento na expectativa de vida em diversas espécies. Superexpressão simultânea de CAT e MnSOD mitocondrial em *Drosophila* transgênica induziu uma diminuição paradoxal da vida, o que pode significar que apenas os níveis fisiológicos de  $O_2^{\cdot-}$  /  $H_2O_2$  (nem excesso nem déficit) promovem o envelhecimento normal. Não houve associação entre A16V, C47T MnSOD ou polimorfismos nas C262T e CAT relacionados à idade, mortalidade ou fenótipos em humanos. No entanto, o genótipo AA MnSOD foi associado com um perfil de imunossenescência e danos ao DNA, enquanto CAT TT foi associado com o funcionamento físico melhorado. Em outro estudo, camundongos expostos a P66 (SHC-/-) tiveram vida prolongada e aumento da resistência ao estresse oxidativo, mas, inesperadamente, centenários apresentaram os maiores níveis basais de p66 (SHC), quando comparado com jovens e idosos.

3. A falta de previsibilidade: Alguns críticos da teoria oxidativa reivindicam que o fracasso das intervenções antioxidantes para parar ou reverter o processo de envelhecimento e para acabar com a atual pandemia de doenças relacionadas à idade (doença cardiovascular, por exemplo) põe a hipótese oxidativa em questão. Não obstante, uma vez que o envelhecimento é uma desregulação complexa de muitos sistemas redox, administração única de

antioxidantes não deve necessariamente influenciar o processo de envelhecimento. Complexos antioxidantes, múltiplas intervenções ou completas mudanças na dieta podem ser mais bem sucedidos a este respeito.

4. Falta de evidência de causa e efeito direta: Apesar de um crescente corpo de evidências apontarem para a implicação de desregulação redox como um importante determinante do envelhecimento, uma relação de causa e efeito direta entre o acúmulo de danos oxidativos e envelhecimento ainda não foi claramente estabelecida.

## **2.7 – DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

As doenças degenerativas do sistema nervoso central são caracterizadas por morte neuronal de evolução gradual e insidiosa, mas progressiva e irreversível. Na grande maioria dos casos os fatores desencadeantes são ainda desconhecidos pela ciência médica. Um grande número de doenças degenerativas está associado a uma transmissão genética, com herança dominante ou recessiva enquanto que outras doenças ocorrem de forma esporádica em casos isolados de uma família.

Estas doenças têm em comum a função mitocondrial prejudicada, aumento de danos oxidativos, defeitos no sistema ubiquitina-proteassoma, presença anormal de proteínas agregadas e alterações no metabolismo do ferro (Markesbery, 1997). Todos estes fatores estão envolvidos em um ciclo repetitivo e que a ação de qualquer um destes fatores, pode iniciar a lesão do neurônio, que por sua vez, “recruta” os outros fatores, com o propósito de destruir a célula. Proteínas oxidadas são comumente removidas pelo proteassoma, à inibição do proteassoma permite o acúmulo anormal de proteínas e conseqüentemente a produção de espécies reativas de oxigênio, porém este mecanismo não está totalmente elucidado. Portanto, as espécies reativas do oxigênio podem iniciar a neurodegeneração, devido à ação destes sobre as mitocôndrias, causando o aumento de  $Ca^{2+}$ , podendo inibir a função do proteassoma. Com o decorrer do tempo (idade do indivíduo) ocorre o acúmulo de ferro em diversas áreas do

cérebro, e este e outros metais promovem a agregação de proteínas (Markesbery, 1997).

Essas doenças neurodegenerativas a serem tratadas nesse trabalho, por sua vez, dividem-se em Doença de Parkinson (PD), Doença de Alzheimer (AD), Esclerose lateral amiotrófica (ALS) e Doença de Huntington (HD).

### **2.7.1 – Doença de Parkinson**

A doença de Parkinson foi primeiramente descrita por James Parkinson em 1817. É uma doença neurológica degenerativa, incurável e progressiva. É uma desordem cerebral que se manifesta devida à perda de neurônios que produzem o neurotransmissor dopamina na substância negra. A dopamina é um mensageiro químico responsável pela coordenação motora. Esta patologia tem como consequência uma série de danos motores. Podem também ocorrer algumas manifestações não motoras, tais como: comprometimento da memória, depressão, alterações do sono e distúrbios do sistema nervoso autônomo <sup>20</sup>.

Aparece em qualquer idade, mas é pouco comum em pessoas com idade inferior a 30 anos. A incidência em homens é ligeiramente maior que nas mulheres, numa proporção de três homens para duas mulheres. Os sintomas de Parkinson traduzem-se em: tremores, rigidez, bradicinesia ou lentidão do movimento e instabilidade postural.

A Doença de Parkinson origina-se de diversas causas, uma dessas causas seria o estresse oxidativo, que forma radicais livres, que são caracterizados por serem moléculas instáveis que reagem com outras moléculas existentes, dando-se assim, um fenômeno de oxidação. Para diversos elementos da célula, como é o caso de mitocôndrias e membrana celular, este fenômeno é nocivo podendo mesmo levar à morte das próprias células. A produção destes radicais é muitas das vezes proveniente do metabolismo normal do organismo. A dopamina é metabolizada essencialmente no cérebro por ação da enzima monoaminaoxidase (MAO) e catecol-o-aminotransferase (COMT) em ácido homovelínico (HVA) e ácido 3,4- dihidrofenilacético (Gadoth, 2011).

A degradação da dopamina em ácido 3,4-dihidroxifenilacético pela MAO gera peróxido de hidrogênio, que na presença de  $Fe^{2+}$ , abundante nos gânglios da base, pode gerar radicais livres hidroxila ( $\bullet OH$ ) (Gadoth, 2011). Em condições normais o organismo elimina estas moléculas indesejáveis através de defesas antioxidantes que possui, porém, por alguma razão, na Doença de Parkinson, há um acúmulo destes radicais na substância negra, o que pode levar ao desencadeamento ou agravamento do processo degenerativo.

A ação de neurotoxinas ambientais ganhou maior fôlego quando em 1971 se descobriu que um toxico, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridina (MPTP), provocava um Síndrome Parkinsônico em tudo semelhante á doença de Parkinson. Esta substância destrói seletivamente neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta. Para a MPTP ser neurotóxica tem que ser oxidada a MPP<sup>+</sup> pela enzima MAO-B (momoamina oxidase B). O MPP<sup>+</sup> é captado por terminais dopaminérgicos e após ser interiorizada inibe a enzima NADH Co Q1 redutase (enzima mitocondrial que atua na cadeia respiratória).

Há, entretanto, drogas que bloqueiam a MAO-B, como é o caso da selegilina, o que leva a um bloqueio da toxicidade do MPTP. Alguns estudos têm constatado uma maior incidência da doença de Parkinson em populações expostas a toxinas agro-industriais e água do poço.

O metabolismo normal da dopamina produz radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, os quais na presença de depósitos de ferro no cérebro poderiam resultar em neurotoxicidade por interferência na cadeia respiratória, suportando assim, a teoria de que a produção de radicais livres pode ser uma causa da doença de Parkinson.

A teoria de que anormalidades mitocondriais são também uma das possíveis causas do desenvolvimento da doença de Parkinson, tem como fundamentos que a inibição do NADH Co Q1 leva á produção excessiva de radicais peróxidos. Neste caso, uma deficiência na cadeia respiratória poderia gerar produtos de oxidação e desencadear uma série de processos que levaria á toxicidade celular.

### 2.7.2 – Doença de Alzheimer

Outra doença neurodegenerativa também que se origina em decorrência do estresse oxidativo seria a Doença de Alzheimer, atualmente incurável mas que possui tratamento. O tratamento permite melhorar a saúde, retardar o declínio cognitivo, tratar os sintomas, controlar as alterações de comportamento e proporcionar conforto e qualidade de vida ao idoso e sua família. Foi descrita, pela primeira vez, em 1906, pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer, de quem herdou o nome. É a principal causa de demência em pessoas com mais de 60 anos, sendo mais de duas vezes mais comum que a demência vascular, sendo que em 15% dos casos ocorrem simultaneamente.

Atinge 1% dos idosos entre 65 e 70 anos mas sua prevalência aumenta exponencialmente com os anos sendo de 6% aos 70, 30% aos 80 anos e mais de 60% depois dos 90 anos <sup>19</sup>. Cada paciente de Alzheimer sofre a doença de forma única, mas existem pontos em comum, por exemplo, o sintoma primário mais comum é a perda de memória. Muitas vezes os primeiros sintomas são confundidos com problemas de idade ou de estresse. Quando a suspeita recai sobre a Doença de Alzheimer, o paciente é submetido a uma série de testes cognitivos e radiológicos. Com o avançar da doença vão aparecendo novos sintomas como confusão mental, irritabilidade e agressividade, alterações de humor, falhas na linguagem, perda de memória em longo prazo e o paciente começa a desligar-se da realidade. Antes de se tornar totalmente aparente o Mal de Alzheimer vai-se desenvolvendo por um período indeterminado de tempo e pode manter-se não diagnosticado e assintomático durante anos (Markesbery, 1997).

A Doença de Alzheimer, em geral está relacionada com a produção de radicais livres, que estão envolvidos na morte dos neurônios. Essa produção excessiva de radicais livres causa danos aos sistemas de membranas neuronais, acarretando uma peroxidação de lipídeos e uma oxidação das proteínas de membrana. Os níveis elevados de ferro podem contribuir para a propagação do processo peroxidativo, liberando aldeídos tóxicos e hidroperóxidos lipídicos no

citoplasma. Esse dano oxidativo à membrana neuronal pode desencadear uma deficiência na homeostase iônica (pelo aumento do influxo de cálcio e a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase mediada pelo efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ) tendo como consequência o aumento dos níveis citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esses eventos ativam a síntese de óxido nítrico cálcio dependente (levando a formação de  $\text{ONOO}^-$  pela reação de óxido nítrico com oxigênio) e ativam, descontroladamente, as proteases cálcio dependentes, como exemplo disso a calpaína, que representam uma família bem conservada de proteases de cisteína dependentes de cálcio. A atividade da calpaína *in vivo* é altamente regulada pelas calpastatinas (calpastatin), as calpastatinas inibem especificamente as calpaínas, não inibindo outras proteases de cisteína, através de suas interações com vários sítios das calpaínas (Passi, 2006).

A disfunção homeostática de cálcio contribui para uma disfunção mitocondrial possivelmente aumentando as taxas normais de produção de  $\text{O}_2^-$ , levando a uma produção de  $\bullet\text{OH}$  e/ou  $\text{ONOO}^-$ . Essa cadeia de eventos pode explicar a disfunção das células nervosas e sua morte no cérebro de um paciente com Doença de Alzheimer, a membrana plasmática com ROS (espécies reativas de oxigênio) acaba gerando danos às proteínas de membrana, perda da homeostase de cálcio e uma disfunção mitocondrial, resultando em necrose. A modificação oxidativa do DNA nuclear e mitocondrial agravam a Doença de Alzheimer, e sua constatação é freqüentemente utilizada como um marcador de estresse oxidativo. De fato, danos extensos do DNA mitocondrial foram observados quando as células PC12 foram expostas ao  $\beta$ -amilóide, mostrando uma correlação direta entre estresse oxidativo e danos no DNA, o DNA mitocondrial (DNAmt) é mais propenso ao dano oxidativo quando comparada com a do DNA nuclear (nDNA), pois o mtDNA está exposto a elevadas concentrações de ROS, enquanto o nDNA está bem protegido pelas histonas (Passi, 2006).

A Doença de Alzheimer tem relação com o processo de envelhecimento normal e elevada liberação de radicais livres no cérebro, no envelhecimento normal, as mitocôndrias naturalmente liberam radicais livres, por serem

altamente reativos, podendo danificar a membrana do neurônio celular do seu DNA.

O envelhecimento acelerado se explica pelo excesso de superoxidodismutase (SOD). O excesso de SOD leva um aumento de  $H_2O_2$  (espécie reativa de oxigênio não radicalar) que ultrapassa as capacidades metabólicas das outras enzimas ligadas à degradação dos radicais livres. Isso poderia levar o envelhecimento acelerado com surgimento de sinais histopatológicos da Doença de Alzheimer, gerando um desgaste nas placas neuríticas, o que pode potencializar o efeito oxidativo no cérebro, acelerando a degeneração neuronal (Mancuso, 2007).

### **2.7.3 – Esclerose Lateral Amiotrófica**

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS) faz parte, junto com a Atrofia Muscular Espinal Progressiva e a Paralisia Bulbar Progressiva, de um grupo de doenças do neurônio motor (Atrofias Musculares Neurogênicas) de etiologia desconhecida, caracterizados por fraqueza muscular e atrofia por denervação. Cinco a dez por cento dos casos são familiares, com herança autossômica dominante.

Nessa síndrome clínica complexa, crônica e progressiva, os pacientes geralmente têm mais de 40 anos e a incidência da doença é maior em homens. Câimbras são comuns e podem anteceder a fraqueza muscular e atrofia que se iniciam pelas mãos, outras vezes pelos pés. A doença se caracteriza por degeneração dos feixes corticospinais (via piramidal) e dos cornos anteriores da medula, motivos pelos quais poderão aparecer fraqueza muscular sem dores, atrofias musculares, fasciculações (movimentos involuntários visíveis em repouso) e espasticidade (contração súbita e involuntária dos músculos). Este quadro começa lentamente a progredir, comprometendo finalmente os membros superiores e inferiores juntamente com a musculatura do pescoço e da língua, em alguns casos. O paciente pode manifestar dificuldade para deglutir, engolir a saliva e os alimentos (disfagia), apresentar perda de peso, e dificuldade na

articulação das palavras (disartria). A fala pode ser flácida ou contraída, podendo haver uma alternância desses dois aspectos. A dificuldade de deglutir resulta em sialorréia (salivação), enquanto as dificuldades de respirar levam a queixas de cansaço.

A morte ocorre geralmente dentro de dois a cinco anos, sendo que 20% dos pacientes sobrevivem seis anos.

A evidência mais convincente da atividade das espécies reativas do oxigênio na patogênese da neurodegeneração tem vindo da ligação da ELA com defeitos no gene SOD1, responsável pela codificação de Cu-ZnSOD ou SOD citoplasmática; com maior incidência de mutações heterozigóticas. A atividade da SOD1 enzimática em pacientes portadores da ELA apresenta-se diminuída em torno de 25% a 80% quando comparada a indivíduos normais, em hemácias, linfoblastos e células neuronais.

O mecanismo pelo qual a expressão de SOD1 leva à perda do neurônio motor é desconhecido, porém especula-se que enzimas “mutantes” possam precipitar, formando agregados citoplasmáticos tóxicos devido a suas mudanças na conformação e meia-vida mais curta, favorecendo a formação de lesões protéicas por peroxinitrito ou falha no acoplamento de cobre, inibido por resíduos tóxicos formados (Sayre, 2005).

#### **2.7.4 – Doença de Huntigton**

A doença de Huntington (HD) é uma disfunção cerebral hereditária, que evolui com degeneração corporal e mental e que passa de uma geração a outra com chance de acometer 50% dos filhos de pais ou mães doentes. As principais características são o aparecimento de movimentos involuntários dos membros, do tronco e da face, diminuição da capacidade intelectual e alterações no comportamento e na personalidade (Bartzokis, 2007).

A maioria das pessoas que possui o gene de Huntington em seu DNA manifesta os primeiros sintomas entre 35 e 45 anos de idade. Há também uma forma juvenil da doença que se desenvolve antes dos 20 anos. A doença afeta

de 5 a 10 pessoas a cada 100 mil, não havendo diferenças entre sexo ou raça.

O defeito genético na Doença de Huntington é uma expansão da repetição do trinucleotídeo CAG no cromossomo 4, que codifica repetições de poliglutamina na proteína huntingtina, a qual, acredita-se, ocasione um ganho tóxico de função, desencadeando o processo neurodegenerativo. A huntingtina mutante seria mais resistente à degradação protéica, levando à formação de agregados citoplasmáticos que causariam a degeneração axonal (Bartzokis, 2007).

A repetição de CAG varia de 10 a 29 cópias em cromossomos normais e está expandida para 36 a 121 nos cromossomos na Doença de Huntington sendo que alelos com 40 ou mais repetições têm penetrância completa, resultando no desenvolvimento da doença. Existe uma relação inversa entre comprimento da repetição e a idade de início da doença, de forma que quanto maior o tamanho da repetição, mais precoce o início da doença. A expansão de trinucleotídeos CAG tende a aumentar em gerações sucessivas, especialmente durante a espermatogênese (os casos de início precoce, geralmente, têm transmissão paterna), levando ao fenômeno da antecipação, isto é, a Doença de Huntington ocorre numa idade mais precoce e de forma mais grave na prole comparada aos pais afetados.

Os pacientes com doença de Huntington apresentam destruição de neurônios de uma parte do cérebro chamada núcleo estriado, que produz o neurotransmissor GABA. A redução da liberação deste neurotransmissor no sistema nervoso determina o aparecimento de movimentos involuntários irregulares e decadência mental progressiva (Mancuso, 2007).

## **2.8 – SISTEMAS ANTIOXIDANTES**

A função de qualquer integrante do sistema antioxidante é controlar o balanço entre a produção e eliminação de RL, ROS, RNS ou qualquer substância que tragam ações oxidativas no organismo causando um desbalanço no sentido pró-oxidativo. Prevenção, interceptação e reparo contra o acúmulo gradual,

envelhecimento, das reações oxidativas no organismo.

Podemos dividir os sistemas antioxidantes entre recursos endógenos e recursos exógenos. Tratando-se dos recursos endógenos temos como principais enzimas antioxidantes a Glutathione(GSH), a Catalase(CAT) e a Superóxido desmutase(SOD) além da ação da NADPH e a produção de outras substâncias, cada uma delas atuando conforme sua especificidade. Tratando-se de recursos exógenos, temos diversas substâncias não enzimáticas como a vitamina C (ascorbato), a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol),  $\beta$ -caroteno, flavonóides, selênio, zinco, licopeno, cobre, compostos fenólicos entre outros. Cada uma com seus respectivos mecanismos de ação.

A ação conjunta da SOD e da CAT converte o superóxido em água. A SOD citosólica (cobre-zinco) e a mitocondrial (manganes) são isoenzimas que dismutam o radical superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio. Sua atividade torna-se diminuída no processo de envelhecimento. Juntamente com a glutathione peroxidase forma um importante sistema de defesa contra a lipoperoxidação, que esta associada ao surgimento de algumas doenças neurodegenerativas. Mais incidentes com o passar dos anos por ter a atividade das isoformas da SOD diminuídas. A CAT é uma proteína que catalisa a dismutação do  $H_2O_2$  a oxigênio molecular( $O_2$ ) e água ( $H_2O$ ) (Halliwell, Gutteridge, 2010).

O NADPH constitui uma reserva importante de potencial redutor para os mecanismos que previnem o estresse oxidativo. A estrutura nativa de muitas proteínas depende da manutenção de grupos SH de resíduos de cisteínas, nesta forma reduzida. As ROS produzidas pelo metabolismo ou resultantes da ingestão de substâncias exógenas (drogas, medicamentos) podem provocar a oxidação de grupos sulfidril a dissulfeto. A glutathione promove a redução das pontes dissulfeto, reconvertendo-as em grupos SH. Ao exercer sua função redutora, os grupos SH de moléculas de GSH são oxidados passando a constituir o grupo S-S da glutathione dissulfeto (GSSG). A restauração da forma SH da glutathione é obtida por reação do NADPH.

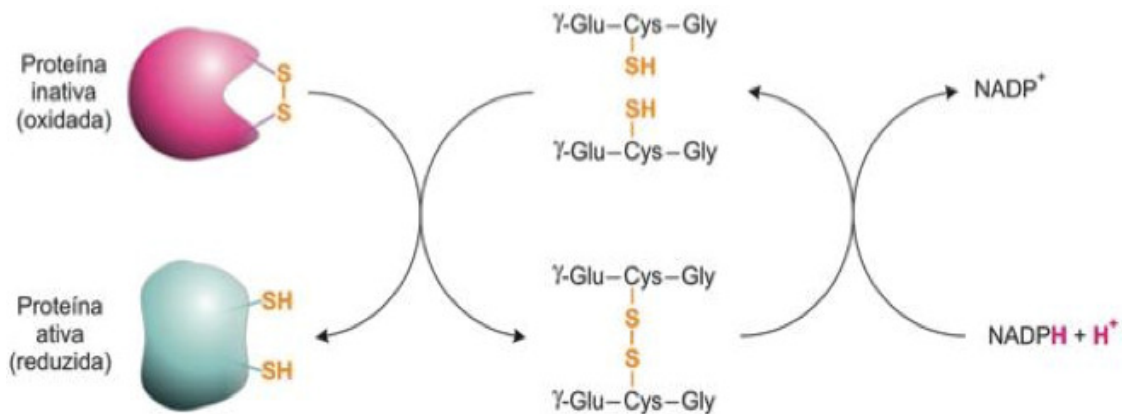


Figura 4 - Atuação da glutatona como agente redutor. A regeneração da forma reduzida da glutatona é obtida por reação com NADPH. (Bayardo e Torres, 2006)

A glutatona também participa da eliminação de peróxidos. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> forma o HO•, que reage com ácidos graxos poliinsaturados componentes de fosfolipídios da membrana plasmática, levando a peroxidação dos ácidos graxos: a estrutura da membrana é rompida provocando lise da hemácia. Os peróxidos - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou peróxido orgânicos (RO<sub>2</sub>H) – são reduzidos pela glutatona pela ação da glutatona peroxidase. A GSSG é reduzida por NADPH, a coenzima da glutatona redutase. É ainda a glutatona responsável pela manutenção do íon ferro do grupo heme da hemoglobina no estado de oxidação 2+, tornando-a capaz de ligar-se com o oxigênio uma vez que a oxidação do íon ferroso a Fe<sup>3+</sup> origina a meta-hemoglobina que não transporta oxigênio (Halliwell, 2007).

A vitamina C, ou ascorbato, tem uma interação sugerida pela literatura com a glutatona de forma a uma poupar a outra. É capaz de neutralizar as ROS e regenerar a vitamina E. Estudos indicam uma potencial diminuição da incidência de câncer em dietas ricas em vitamina C. Ainda há a associação de suplementação ou complementação alimentar no retardo do avanço de doenças como catarata além de estar associada com a prevenção de acidentes ateroscleróticos (Halliwell, 2007).

A vitamina E, devido as suas propriedade lipofílicas, é eficiente na proteção de membranas contra a lipoperoxidação. Alguns estudos indicam que a ingestão

diária, e não a suplementação tem potencial efeito preventivo contra o desenvolvimento de Parkinson (Halliwell, 2007).

Existem mais de 600 carotenóides identificados na natureza. Tal substância atua como antioxidante, reagindo mais rapidamente com os radicais peroxila sendo, assim, “destruídos” pelo organismo. Merecendo maior destaque para o sistema antioxidante temos o  $\gamma$ -caroteno e o  $\beta$ -caroteno. O  $\beta$ -caroteno também é eliminador de radicais peroxila. Esta atividade pode ser também exibida por outros carotenóides.

A restrição calórica reverte alguns efeitos do envelhecimento: desvia o metabolismo do nutriente glicose da produção de ATP para a produção de NADPH que, como visto anteriormente, tem um papel importante como agente redutor em mecanismos antioxidantes. É a única metodologia comprovada pela literatura que realmente tem efeitos diminuição da produção de RL, ROS e RNS por estar embasada nesse desvio de caminho no metabolismo (Augusto, 2006).

## **2.9 – MODULAÇÃO DO METABOLISMO REDOX ATRAVÉS DO EXERCÍCIO FÍSICO**

### **2.9.1 – Fontes Aeróbias Produtoras de ROS**

A hemoglobina é um importante transportador do  $O_2$  nos mamíferos sendo capaz de ligar-se a essa molécula devido a afinidade do íon  $Fe^{2+}$  com o  $O_2$ . Tal função desempenha um papel regulador do pH sanguíneo. A mioglobina, por sua vez, demonstra uma capacidade estocadora de  $O_2$  liberando-o somente quando seus níveis encontram-se muito baixos.

Os barorreceptores carotídeos possuem um papel fundamental no controle dos ritmos respiratório e cardíaco visto que desempenham papéis sensitivos quanto a disponibilidade de  $O_2$  no tecido sanguíneo. Esses sistemas sensoriais de  $O_2$  aparentam estar envolvidos com a atividade da enzima heme-oxigenase, um possível sitio produtor de ROS, que por sua vez, mostra-se relacionada com a atividade de NADPH-oxidase, também produtora de ROS. Quando esses barorreceptores permanecem muito tempo ativos devido ao

aporte diminuído de  $O_2$ , é interpretada a necessidade de aumento do ritmo respiratório. Se essa situação de hipóxia perdura, há a utilização do glicogênio e, na falta do mesmo, maior utilização de glicose acelerando o processo de glicólise (Halliwell, Gutteridge, 2010).

Os mecanismos básicos de formação de RL e ROS no metabolismo aeróbio são:

- Na mitocôndria, onde o oxigênio molecular ( $O_2$ ) é reduzido parcialmente e formando o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) (Fig. 1) em uma reação de redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) catalisada por um íon metálico ( $Fe^{2+}$ ) através da reação de Fenton (Fig. 3). Para que esses elétrons sejam transportados há a utilização de importantes carreadores como nicotiamida dinucleotídeo ( $NAD^+$ ) e flavinas como a flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenine dinucleotídeo (FAD) no processo da cadeia de transporte de elétrons (CTE).
- Citocromo P450 (CyP) presente no retículo endoplasmático (RE) e algumas outras organelas. Cataliza a oxidação de substratos através do  $O_2^{\cdot -}$ . O fígado é um órgão rico em RE com altas concentrações de CyP.

### 2.9.2 – Fontes Anaeróbias Produtora de ROS

Enzimas oxidases e oxigenases as quais utilizam o  $O_2$  não utilizado pela mitocôndria participam desse processo. De um modo amplo, essas enzimas tem pouca afinidade com o  $O_2$  (Halliwell, Gutteridge, 2010). Nesta via, a produção de EROs se dá principalmente pela redução de íons ferro no plasma, tecidos musculares e endotélio. (Radák, 2000; Souza-Junior et al, 2012).

A xantina oxidase (XO), uma das principais enzimas citosólicas produtoras de EROs e antioxidantes (Radák, 2000), é regulada pela adenosine monofosfato (AMP) de forma que em repouso uma pessoa tem baixa atividade de XO sendo a resposta inversamente proporcional para maiores disponibilidades de adenosina trifostato (ATP). Sua atividade pode ser alterada conforme condições de normóxia, atuando como oxidase, e situações de hipóxia, atuando como desidrogenase (XDH), assim mostrando não ser regulada somente pela AMP,

mas também pelo aporte de  $O_2$  para o organismo. Tais respostas levam a produção tanto de EROS quanto de ácido úrico (AU) (antioxidante produto final oxidação de hipoxantina a xantina e então AU), sendo gerado também radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e EROS peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na via catabólica das purinas (Fig. 5) (Barros et al, 2008; Souza-Junior et al, 2012).

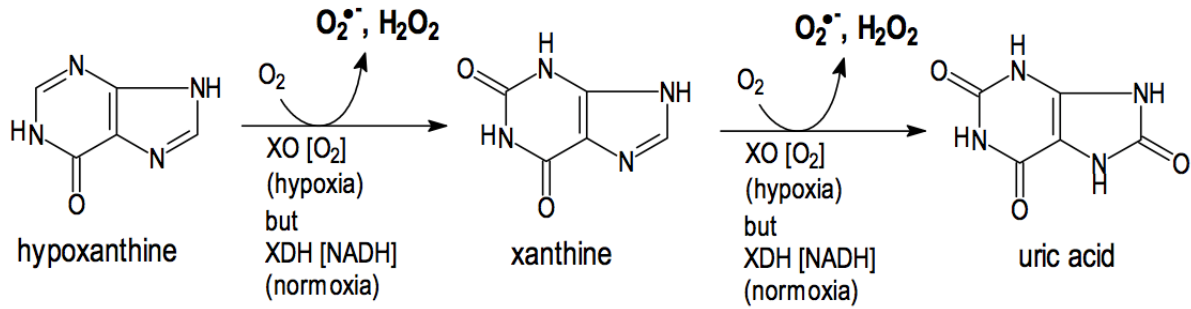


Figura 5: Conversão de hipoxantina a ácido úrico na via das purinas e pirimidinas. Enzima atuando como xantina oxidase (XO) em condições de hipóxia e como xantina desidrogenase (XDH) em condições de normóxia (Barros et al, 2008).

Como modelo teórico da integração nessa via anaerobia de produção de ROS e balanço redox temos um modelo descritivo na Figura 6.

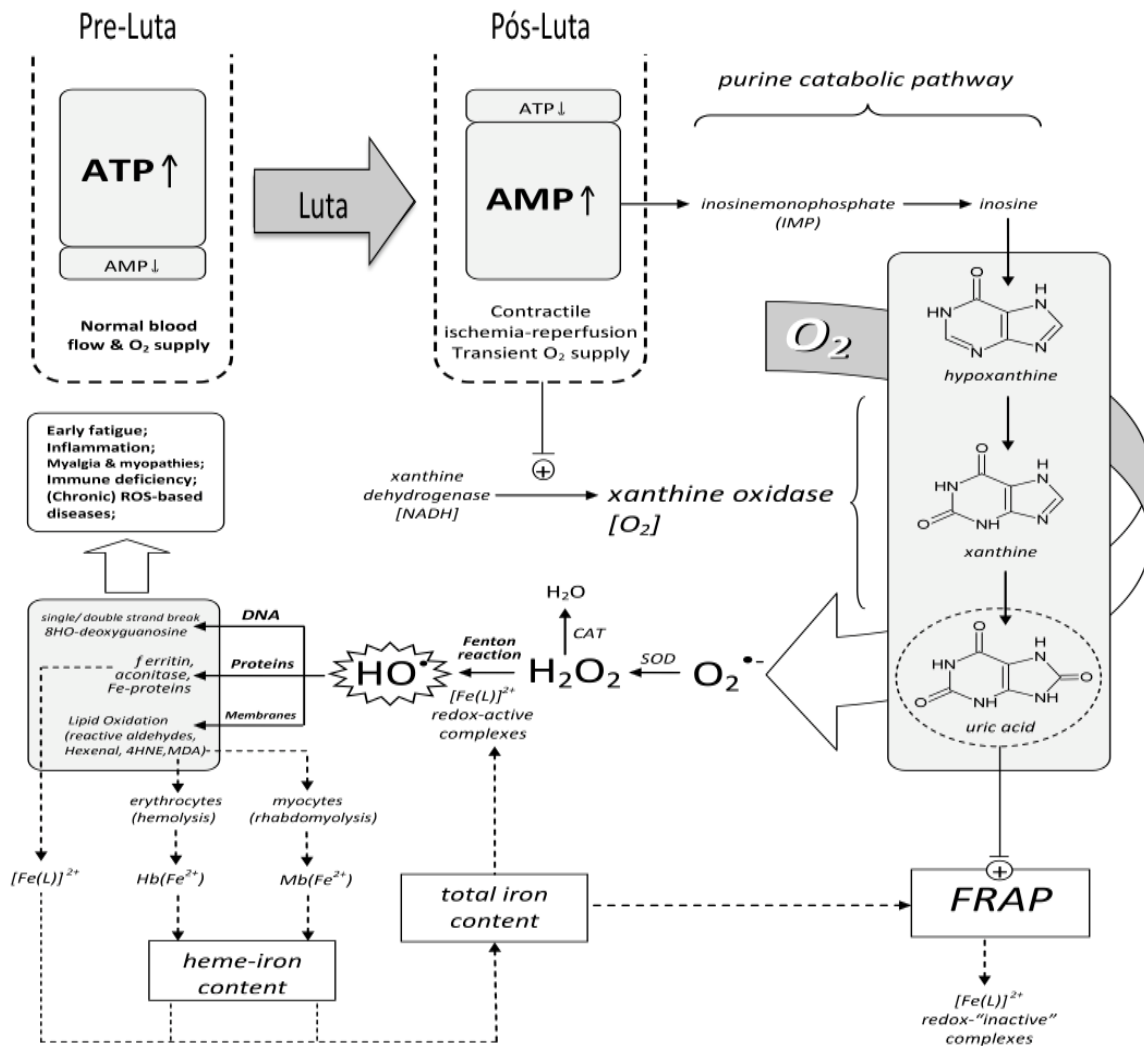


Figura 6: Esquema metabólico dos processos envolvidos na formação de espécies reativas de oxigênio, modificações oxidativas a biomoléculas, mudanças na homeostase de ferro, e respostas antioxidantes no plasma. Abreviações: CAT, enzima catalase; [Fe(L)]<sub>2+</sub>, Fe<sub>2+</sub>: complexado; FRAP, atividade redutora do ferro em plasma; Hb(Fe<sub>2+</sub>), hemoglobina; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrogênio; HO<sup>•</sup>, radical hidroxil; 4HE, 4-hidroxinonenal; Mb(Fe<sub>2+</sub>), mioglobina; MDA, malondialdeído; ROS, espécies reativas de oxigênio; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical superóxido; SOD, enzima superóxido dismutase (Adaptado de Souza-Junior et al., 2012, In Press).

### **3.0 CONCLUSÕES**

Visto as distintas modulações metabólicas no metabolismo redox geradas pelo exercício físico, tanto em sua predominância aeróbia quando em sua predominância anaeróbia, fica evidenciado que as diversas modulações nos sistemas antioxidantes e na relação entre produção e remoção de ERO e ERN podem tornar-se, até um certo ponto, modulável auxiliando no controle do estresse oxidativo e alterações metabólicas geradas por doenças neurodegenerativas, sejam em seus processos de sinalização intra e extra celular, seja na diminuição no acúmulo de lesões teciduais ou em alterações metabólicas relacionadas com a proliferação celular desses carcinomas. Conseqüentemente, pode-se melhorar a qualidade de vida dos acometidos através de exercícios físicos sistematizados.

## REFERÊNCIAS

1. Augusto O, Radicais Livres: Bons Maus e Naturais. Oficina de Textos, 1ed, 2006.
2. Teston AP, Nardino D, Pivado L. Envelhecimento cutâneo: teoria os radicais livres e tratamentos visando a prevenção e o rejuvenescimento. Rev Uninga 2010; 24: p. 71-92
3. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 1956;11 (3): 298–300.
4. Barros MP, Brigagão MRPL, Mattei R. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante de princípios ativos aplicados na profilaxia de doenças neurodegenerativas. In: ALMEIDA RN. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 21, p.237- 261.2006
5. Hirata LL, Sato MEO, Santos M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. *Acta Farm. Bonaerense* 2004; 23 (3): 418-24.
6. Harper CR, Jacobson TA. Beyond the Mediterranean diet: the role of omega-3 Fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Prev Cardiol.* 2003 Summer;6(3):136-46.
7. Melov S. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Nov;34(11):1395- 400.
8. Abbas A K, Lichtman A H, Pillai S, *Imunologia Celular e Molecular.* Elsevier. 6ed, 2008.
9. Wang P G, Cai T B, Taniguchi N, Nitric Oxide Donors. Wiley-VCH. 1ed, 2005
10. Mattei, R. Produtos Naturais na Proteção do Dano Oxidativo, Estresse e Estresse Oxidativo. (Radicais Livres e Estresse Oxidativo: Possíveis Intervenções Farmacológicas. INFAR) São Paulo, UNIFESP, 2011.
11. Florez-Duquet M, McDonald RB. Cold-induced thermoregulation and biological aging. *Physiol Rev* 1998;78:339-58.
12. Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B. The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med.* 2007; 53(3):207-13.
13. Sonenreich, 1979 IN: Persoli, RM. Processos Neurodegenerativos e

EROs/ERNs: Envelhecimento e Doenças Neurodegenerativas. (Radicais Livres e Estresse Oxidativo: Possíveis Intervenções Farmacológicas. INFAR) São Paulo, UNIFESP, 2011.

14. Harman, D. A biologic clock: the mitochondria?. *Journal of the American Geriatrics Society* 1972;20 (4): 145–147.

15. Alexeyev MF. Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? *FEBS J.* 2009; 276(20):5768-87.

16. Alves 2005

17. Romano AD, Serviddio G, de Matthaes A, Bellanti F, Vendemiale G. Oxidative stress and aging. *J Nephrol.* 2010; 23 (suppl 15): S29-36.

18. Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *J Signal Transduct.* 2011, oct(2): 1-13.

19. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(1):134-47.

20. Gadoth N., Gobel H.H., Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. Humana Press. 2011

21. Passi S, Gianni G, Cocchi M. Oxidative stress in brain: neurodegenerative disease and possible treatment. *Prog. Nutr.* 2006;8:241-56.

22. Mancuso C, Scapagini G, Currò D, et al. Mitochondrial dysfunction generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci.* 2007;12: 1107-23.

23. Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, et al. Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanita.* 2005;41:143- 64.

24. Bartzokis G, Lu HP, Tishler TA, et al. Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment Implications. *Neurochem Res.* 2007;32: 1655-64.

*FEBS J.* 2009; 276(20):5768-87.

25. Hiroki Yokoo, Seiichi Chiba, Kengo Tomita, Michinori Takashina, Hiroshi Sagara, Saburo Yagisita, Yasuo Takano, Yuichi Hattori. Neurodegenerative Evidence in Mice Brains with Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis: Preventive Effect of the Free Radical Scavenger Edaravone. *Plos One*, 2012;12,

v7.

26. Barry Halliwell, John M. C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, 4ed, 2007.