

RADICAIS LIVRES: EM BUSCA DO EQUILÍBRIO

Felipe Martelli
Francis Morais Franco Nunes

Radicais livres! Estresse oxidativo! Esses temas são comumente abordados de forma pejorativa, associados ao envelhecimento e doenças. No entanto, os radicais livres e demais espécies reativas são fundamentais para a homeostase celular e o funcionamento adequado dos organismos vivos. Neste artigo, revisamos os malefícios e benefícios desses compostos.

QUEM SÃO AS ESPÉCIES REATIVAS E OS RADICAIS LIVRES? As espécies reativas são átomos, moléculas, ou íons derivados do oxigênio, que em sua grande maioria possuem alta reatividade e constituem três classes de compostos: espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As espécies reativas podem ainda ser didaticamente divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares (1;2).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos. Isso permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas. Alguns exemplos são: OH^\bullet (íon hidroxila), HOH^\bullet (íon peroxil), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (ânion superóxido), NO (óxido nítrico) e O_2 (oxigênio molecular). Os radicais livres podem agir como aceptores ou doadores de elétrons, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor. Os compostos não radicalares, como H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e HOCl (ácido hipocloroso), não possuem elétrons livres, sen-

do portanto menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas na sua redondeza (1;2).

ALGUMAS FONTES DE ESPÉCIES REATIVAS E RADICAIS LIVRES Os radicais livres são naturalmente produzidos pelo metabolismo dos seres vivos. As mitocôndrias são a maior fonte endógena de produção de radicais livres nos eucariotos (3). O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é o mais comumente gerado, a partir de elétrons que escapam da cadeia transportadora das mitocôndrias e reduzem o O_2 presente nas células. Outra fonte de radicais livres no organismo são células do sistema imunológico, produtoras de enzimas NADPH Oxidase (Nox) que produzem uma grande quantidade de $\text{O}_2^{\bullet-}$ capaz de matar microrganismos invasores (1; 4). Células nervosas, epiteliais, endoteliais e macrófagos produzem a enzima óxido nítrico sintetase, responsável pela produção de NO (4; 5).

Fontes externas, como a radiação UV (6), tabagismo, poluentes, drogas, dietas excessivamente calóricas, excesso de exercícios físicos, pesticidas e solventes industriais, também podem induzir a formação de radicais livres (2).

A TEORIA DO ENVELHECIMENTO E O PARADOXO DOS RADICAIS LIVRES

Em 1956, o gerontologista norte-americano, doutor Denham Harman, propôs a Teoria do Envelhecimento via Radicais Livres, cujas ideias foram aperfeiçoadas, em 1972, na Teoria do Envelhecimento dos Radicais Livres Mitocôndriais (MFRTA). A teoria propõe que o envelhecimento seja causado devido à toxicidade gerada pelos radicais livres em decorrência de um ciclo vicioso no qual mais danos aos constituintes mitocondriais culminam na produção de mais radicais. Essa teoria é considerada uma das mais robustas para explicar o processo do envelhecimento (3; 7).

Ao longo das décadas seguintes, muitos dados foram corroborando a teoria de Harman, observando-se forte correlação positiva entre: 1 - envelhecimento e o aumento do dano oxidativo; 2 - perda das funções mitocondriais com o envelhecimento; 3 - elevado dano oxidativo em muitas doenças associadas à idade; 4 - produção contínua de radicais livres pelas mitocôndrias ao longo da vida; 5 - redução do estresse oxidativo em tratamentos que aumentam a longevidade, como restrições calóricas (3; 7).

Com os recentes refinamentos das técnicas laboratoriais, emergiram dados, de invertebrados a humanos, incompatíveis com a MFRTA, por exemplo: 1) falta de compatibilidade entre os níveis de produção de radicais livres e a longevidade; 2) efeitos deletérios ao invés de benéficos quando antioxidantes foram administrados; 3) a inativação ou superexpressão de enzimas antioxidantes em mutantes não diminuíram ou aumentaram, respectivamente, a longevidade; 4) organismos mutantes muito longevos, apresentavam elevados níveis de dano oxidativo (3; 8; 9).

Mutações que inativam o gene codificador da enzima antioxidante superóxido dismutase 2 (*Sod2*) do nematóide *Caenorhabditis elegans*, embora aumentem o dano oxidativo, também promovem um aumento considerável da longevidade (10). Camundongos mutantes que possuem um único alelo funcional do gene *Sod2*, apresentam aumento no dano oxidativo e formação de câncer, contudo, a mesma longevidade de camundongos com os dois alelos funcionais (11). Em outra pesquisa, camundongos duplo-mutantes para os genes *Sod2* e *Gpx1*, que codifica outra enzima antioxidante conhecida por glutathione peroxidase, embora tivessem uma severa deficiência do sistema antioxidante, não apresentaram encurtamento da longevidade (12).

Até mesmo os aspectos do ciclo vicioso da MFRTA foram recentemente refutados (13). O genoma mitocondrial fica em contato direto com a maior fonte celular de radicais livres, que é a cadeia respiratória mitocondrial. O genoma nuclear, por sua vez, fica protegido pela carioteca, portanto, menos exposto aos radicais livres. No entanto, demonstrou-se em roedores que os níveis de dano oxidativo no DNA mitocondrial não são maiores que os observados no DNA genômico, talvez por haver uma melhor eficiência de enzimas de reparo de DNA sobre o genoma das mitocôndrias do que do genoma nuclear (13).

O VERDADEIRO VILÃO Em condições celulares normais, há um equilíbrio entre a produção de radicais livres e sua neutrali-

zação pelos sistemas antioxidantes. No entanto, quando tal equilíbrio tende para uma produção excessiva desses compostos ou para uma deficiência dos sistemas antioxidantes, surge a condição de estresse oxidativo, a qual é prejudicial aos componentes celulares e indivíduos como um todo (2). O estresse oxidativo causa uma gama de lesões aos constituintes celulares como: a peroxidação dos lipídeos de membrana; oxidação de receptores hormonais e enzimas (1; 14); e lesões no material genético, como oxidações de bases do DNA que podem culminar em processos mutagênicos e tumorais (15).

Em pacientes com câncer, o estresse oxidativo altera a expressão de genes que inibem a progressão do ciclo celular (chamados genes supressores tumorais), aumentando a proliferação das células cancerosas (16). Em diabéticos, a hiperglicemia por períodos prolongados pode promover um desbalanço metabólico, resultando em atividade mitocondrial irregular e produção excessiva de radicais livres, o que pode gerar as complicações inflamatórias ligadas à doença (17). O estresse oxidativo é também uma das únicas características comuns a todas as doenças cardiovasculares, por exemplo, causando oxidação de lipídeos e proteínas e formação de arteriosclerose (18). O estresse oxidativo está associado ao câncer de pele e à doenças inflamatórias, por aumentar a taxa de mutação no material genético ou a susceptibilidade a agentes mutagênicos (19).

Causam ainda infertilidade masculina (devido ao excesso de radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio no líquido seminal) e feminina (como endometriose e síndrome de ovário policístico), pois o processo de crescimento e amadurecimento de óvulos é dependente da sinalização por espécies reativas e ação de antioxidantes (20; 21). O estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (19). O cérebro é o órgão com maior consumo metabólico do corpo, sobretudo de glicose e oxigênio, ficando frequentemente exposto a um excesso de radicais livres que podem desencadear o início do dano neuronal (22). O cérebro de mamíferos é especialmente sensível ao estresse oxidativo por apresentar uma baixa defesa antioxidante se comparada a outros tecidos do corpo (19).

O QUE SE SABE SOBRE O PAPEL DOS RADICAIS LIVRES HOJE? Em função das ações prejudiciais causadas pelo estresse oxidativo que comprometem as diversas atividades celulares, radicais livres e espécies reativas, de forma geral, têm carrega-

do o ônus de desempenhar papéis danosos. Contudo, uma série de estudos tem revelado que a formação contínua de radicais livres é fundamental para o funcionamento fisiológico e celular adequado, produção de energia e metabolismo bem regulado (23).

O maior exemplo disso é o próprio oxigênio atmosférico que, por apresentar um elétron desemparelhado e ser tóxico em excesso, é um radical livre. essencial para a vida. Excetuando-se alguns organismos anaeróbicos, todas as formas de vida do planeta utilizam o O_2 para sobreviver, sem o qual seria impossível produzir energia para a atividade celular (1).

A chave para se entender a dualidade da questão que envolve os radicais livres reside na compreensão de que tudo é uma questão de dosagem. Na condição de equilíbrio entre produção de radicais livres e atuação da defesa antioxidante, esses compostos regulam o funcionamento fisiológico. Os radicais controlam a força e duração da sinalização celular, por meio de processos cíclicos de oxidação/redução em proteínas-chave como cinases, fosfatases e fatores de transcrição. A geração de espécies reativas dentro de certos limites é fundamental para manter a homeostase celular, tendo um papel como mensageiros em vias de sinalização de insulina, hormônio de crescimento, citocinas, entre outras vias, como as vias que regulam a atividade das enzimas antioxidantes e até mesmo controlar a expressão de alguns grupos de genes, como genes envolvidos no metabolismo mitocondrial (3; 4; 9; 13). Existem até mesmo genes responsáveis pelo sensoriamento do status oxidativo celular, como o gene Nrf2 presente em mamíferos. Em condições em que a concentração de radicais livres está dentro de limites saudáveis, a proteína produzida por esse gene ativa outros genes envolvidos na defesa antioxidante e na manutenção do ciclo celular (24). Quando a concentração de radicais supera os limites saudáveis e se estabelece a condição de estresse, a proteína Nrf2 ativa genes que promovem a morte celular (25).

As famílias de proteínas Nox (NADPH oxidase) e Duox (Dual peroxidase) são importantes fontes produtoras de superóxido e peróxido de hidrogênio na célula, por meio de sua capacidade de doação de elétrons ao oxigênio. As espécies produzidas por essas famílias de enzimas desempenham funções na remodelagem do citoesqueleto, transdução de sinais, expressão gênica, diferenciação celular, proliferação, migração e apoptose, cumprindo papéis na fisiologia

cerebral, nos sistemas imune, vascular e digestivo e produção de hormônios (4; 26). O óxido nítrico é um radical livre envolvido em processos fisiológicos como: neurotransmissão, vasodilatação e citotoxicidade (4; 5).

A produção de radicais livres em práticas esportivas moderadas atua em vias de sinalização de processos inflamatórios como $NF-\kappa\beta$, melhorando a resposta antioxidante na musculatura estriada esquelética e tendo efeitos benéficos sobre patologias como a osteoporose (27).

A ausência de radicais livres pode, em certo ponto, até mesmo ser danosa. Como dito anteriormente, as enzimas NADPH oxidase presentes em células do sistema imunológico são produtoras de superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Deficiências nessas enzimas que resultem em uma baixa produção deste radical livre podem desencadear o surgimento de doenças granulomatosas. Nesses casos, os pacientes tornam-se alvos frequentes de infecções, uma vez que esse radical livre é fundamental para matar microrganismos invasores (1).

Muitas pesquisas vêm, ainda, apontando o papel benéfico das espécies reativas em vários aspectos relacionados à longevidade e ao envelhecimento. Sabe-se que as espécies reativas podem induzir a autofagia em células lesionadas e também ativar o sistema de reparo do material genético quando este é danificado (28). Mutações em componentes da cadeia fosforilativa nas mitocôndrias, ou o uso de pró-oxidantes (compostos que induzem estresse oxidativo, como metais de transição a exemplo do ferro), que resultam no aumento do radical superóxido, promovem o aumento da longevidade no nematóide *C.elegans* e leveduras, e esse efeito é abolido pela administração de vitamina C (um antioxidante) (3).

De forma geral, muitos dados recentes vêm mostrando que tanto a geração de radicais livres em níveis adequados quanto a consequente indução do sistema antioxidante contribuem com a longevidade (8).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E MUDANÇA DE PARADIGMA Hoje é amplamente aceito que o envelhecimento está relacionado à perda da homeostase devido ao acúmulo de dano em moléculas como lipídeos, DNA e proteínas (3; 9). É muito provável que os radicais livres estejam sim correlacionadas ao envelhecimento, mas não da forma que se acreditava até alguns anos atrás. A geração de radicais livres, e de espécies reativas no geral, provavelmente represente um sinal de estresse do organismo em resposta ao dano

dependente da idade, uma vez que sua produção aumenta continuamente com o envelhecimento, até que sua ação deixe de ser benéfica tornando-se danosa (1; 3).

A visão de que os radicais livres são apenas agentes tóxicos que trazem malefícios a saúde é uma visão limitada que denota apenas um recorte da enorme diversidade de ações desempenhadas por esses compostos nos seres vivos. A ciência ainda está longe de compreender todos os processos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao envelhecimento. Contudo, já se faz necessário aprofundar o debate e reconciliar os resultados contraditórios sobre os radicais livres rumo a uma "Teoria Neo-Harmanista", que abranja todos os fenômenos relacionados à dualidade desses compostos, olhando para os processos de forma holística e entendendo-se que o papel dessas espécies depende completamente do ambiente em que se encontram.

Felipe Martelli é biólogo formado pela Universidade de São Paulo (USP) e atualmente é mestrando do Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Investiga os efeitos da nutrição sobre a longevidade e estresse oxidativo no modelo *Apis mellifera*. Email: felipemartelli@usp.br

Francis Moraes Franco Nunes é biólogo, mestre e doutor em genética e professor adjunto do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Investiga interações entre fatores genéticos e ambientais que governam a manifestação de fenótipos complexos. Email: francis.nunes@ufscar.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Magder, S. "Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?" *Critical Care*, 10, 208. 2006.
- Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R. "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15. 2013.
- Hekimi, J. L.; Lapointe, J.; Yang, W. "Taking a 'good' look at free radicals in the aging process". *Trends in Cell Biology*, 21, 569. 2011.
- Lambeth, J. D.; Neish, A. S. "Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression". *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 119. 2014.
- Moncada, S.; Higgs, E. A. "The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology." *British Journal of Pharmacology*, 147, 193. 2006.
- Herrling, T.; Jung, K.; Fuchs, J. "Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin". *Spectrochimica Acta Part A*, 63, 840. 2006.
- Del Valle, L. G. "Oxidative stress in aging: theoretical outcomes and clinical evidences in humans". *Biomedicine & Aging Pathology*, 1, 1. 2011.
- Ristow, M.; Schmeisser, S. "Extending life span by increasing oxidative stress". *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 327. 2011.
- Sohal, R. S.; Orr, W. C. "The redox stress hypothesis of aging". *Free Radical Biology & Medicine*, 52, 539. 2012.
- Van Raamsdonk, J. M.; Hekimi, S. "Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*". *PLoS Genetics*, 5, 1. 2009.
- Van Remmen, H.; et al. "Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging". *Physiological Genomics*, 16, 29. 2003.
- Zhang, Y.; Iet al. "Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity". *The Journals of Gerontology*, 64, 1212. 2009.
- Lim, K. S.; Jeyaseelan, K.; Whiteman, M.; Jenner, A.; Halliwell, B. "Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042, 210. 2005.
- Leonarduzzi, G.; Sottero, B.; Poli, G. "Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited". *Pharmacology & Therapeutics*, 128, 336. 2010.
- Svilar, D.; Goellner, E. M.; Almeida, K. H.; Sobol, R. W. "Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage". *Antioxidants & Redox Signaling*, 14, 2491. 2010.
- Afanasyev, I. "New nucleophilic mechanisms of ROS-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer". *Aging and Disease*, 5, 52. 2014.
- Blake, R.; Trounce, I. A. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 1404. 2014.
- Ho, E.; Galougahi, K. K.; Liu, C. C.; Bhindi, R.; Figtree, G. A. "Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice". *Redox Biology*, 1, 483. 2013.
- Saeidnia, S.; Abdollahi, M. "Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273, 442. 2013.
- Agarwal, A.; et al. "The effects of oxidative stress on female reproduction: a review". *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10, 1. 2012.
- Agarwal, A. "Role of oxidative stress in male infertility and antioxidant supplementation". *Business Briefing: US Kidney & Urological Disease, Infertility*, 122. 2005.
- Yepes, J. N.; et al. "Antioxidant gene therapy against neuronal cell death". *Pharmacology & Therapeutics*, 142, 206. 2014.
- Rahal, A.; et al. "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay". *BioMed Research International*, 2014, 1. 2014.
- Maher, J.; Yamamoto, M. "The rise of antioxidant signaling — The evolution and hormetic actions of Nrf2". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 244, 4. 2010.
- Zucker, S. N.; et al. "Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9". *Molecular Cell*, 53, 916. 2014.
- Brown, D. I.; Griendling, K. K. "Nox proteins in signal transduction". *Free Radical Biology & Medicine*, 47, 1239. 2009.
- Filaire, E.; Toumi, H. "Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: Friend or enemy?" *Joint Bone Spine*, 79, 341. 2012.
- Scherz-Shouval, R.; Elazar, Z. "Regulation of autophagy by ROS: Physiology e pathology". *Trends in Biochemical Sciences*, 36, 38. 2011.