



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

STRESS OXIDATIVO MITOCONDRIAL E CANCRO

Trabalho submetido por
Mariana Varela Alves Da Silva Salgueiro
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Carlos Monteiro

Outubro de 2015

**Dedico esta tese aos meus pais por terem sido o meu
pilar durante este percurso todo!**

Agradecimentos

A realização desta tese afim de concluir o mestrado em Ciências Farmacêuticas só foi possível graças à ajuda e disponibilidade de certos intervenientes, aos quais quero agradecer. Em primeiro lugar aos meus pais, por me terem proporcionado a oportunidade de frequentar o mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas. Obrigada por todo o apoio incondicional, carinho, motivação e força mesmo estando do outro lado do Mundo. Ao meu irmão Rodrigo por ter sido sempre um óptimo apoio em qualquer fase da minha vida.

Um agradecimento especial ao meu orientador, o Professor Doutor Carlos Monteiro por me ter proporcionado a realização deste tema de trabalho. Obrigada por todo o tempo disponibilizado e pelo apoio, paciência, compreensão, motivação e ajuda ao longo de todo o trabalho, pois sem a sua disponibilidade este trabalho não seria possível. À minha avó Júlia, por ter sido uma segunda mãe ao longo destes últimos três anos. Obrigada por todo o apoio e carinho incondicional. À minha família por ter sido um porto seguro durante estes últimos anos. À minha colega de curso e amiga desde o início desta aventura Ema Simão, por toda a amizade e companheirismo prestado ao longo destes cinco anos. Obrigada por teres estado sempre presente e por ter sido muito mais fácil fazermos este percurso juntas. À minha amiga Patrícia Ramos por ter sido uma segunda irmã nestes últimos três anos. Obrigada por toda a motivação, ajuda e disponibilidade durante a realização desta tese; e por toda a amizade demonstrada em qualquer situação. Um outro agradecimento especial à Madalena Martins por ter sido um pilar e também uma verdadeira amiga ao longo deste curso, principalmente nos últimos três anos. Aos meus colegas de curso Alexandre Rebocho, Ema Simão e Rui Fernandes por termos formado o melhor grupo de faculdade. Obrigada por todos os momentos partilhados, pelas brincadeiras, pelo companheirismo, pelo apoio, pela verdadeira amizade, e por todas as sessões de estudo e trabalhos de grupo. À minha afilhada Margarida Camoesas por me ter escolhido e por me ter acompanhado sempre ao longo deste percurso. Por fim a todos os meus amigos e colegas que fizeram parte desta longa aventura de 5 anos!

A todos, muito obrigada!

Resumo

A mitocôndria é a principal responsável pelo fornecimento de energia, trifosfato de adenosina, ATP (adenosine triphosphate), às células e a maior produtora de espécies reativas do oxigênio, ROS (reactive oxygen species), tais como o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^{\bullet}). A manutenção de um equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes é crucial para o bom funcionamento do organismo humano. No entanto, pode ocorrer um desequilíbrio devido à produção excessiva de ROS ou à deficiência de defesas antioxidantes. A este desequilíbrio dá-se o nome de *stress* oxidativo. O excesso de ROS pode danificar o DNA, os lípidos ou as proteínas; e levar ao aparecimento de diversas doenças, incluindo o cancro.

O genoma mitocondrial é mais susceptível a mutações por possuir limitações nos mecanismos de reparação. As lesões ao nível do DNA mitocondrial (mtDNA) podem ser mutações nas regiões codificantes ou na região D-loop (displacement loop), ou simplesmente alterações do número de cópias de mtDNA.

Para se defender do *stress* oxidativo, o organismo desenvolveu mecanismos de defesa endógena antioxidante. As defesas dividem-se em enzimáticas como por exemplo a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase; e em não enzimáticas, como por exemplo as vitaminas A, C e E. Uma alimentação rica em nutrientes com propriedades antioxidantes pode ser benéfica na prevenção contra a oxidação. No entanto, o excesso de nutrientes com propriedades antioxidantes ou mesmo de suplementos antioxidantes podem ser cancerígenos.

Palavras-chave: Stress oxidativo; Mitocôndria; ROS; Cancro.

Abstract

Mitochondria are mainly responsible in supplying cells with energy, ATP (adenosine triphosphate) and are also the major producer of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^{\bullet}). Maintenance of equilibrium between ROS production and antioxidant defences is a crucial condition for a good organism functioning. However, an imbalance can occur due to excessive production of ROS or antioxidant defences deficiency. This imbalance is called oxidative stress. Oxidative stress can damage DNA, lipids or proteins, and lead to several diseases, including cancer.

The mitochondrial genome is more susceptible to DNA damage due to scarcity of repairs mechanisms. Lesions of mitochondrial DNA can be mtDNA coding sequences or the displacement-loop region or simply changes in the mtDNA copy number.

To protect against the oxidative stress, the organism has developed mechanisms of endogenous defence. The defences are divided into enzymatic such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase; and in non-enzymatic, such as vitamins, C, E and A. A diet rich in nutrients with antioxidant properties can be beneficial in preventing oxidation. However, excess of nutrients with antioxidant properties or even antioxidant supplementation can be carcinogen.

Keywords: Oxidative Stress; Mitochondria; ROS; Cancer

Índice

I. Introdução	15
1.1 A mitocôndria	15
1.1.1 Estrutura e Funções	15
1.1.2 Cadeia Respiratória mitocondrial	16
1.1.2.1 Complexo I - NADH: ubiquinona oxidoredutase	16
1.1.2.2 Complexo II - Succinato: ubiquinona oxidoredutase	17
1.1.2.3 Complexo III - Ubiquinol: citocromo c oxidoredutase	19
1.1.2.4 Complexo IV - Citocromo c: O ₂ oxidoredutase	20
1.1.2.5 ATP Sintetase	21
1.1.2.6 Inibidores	22
1.1.2.7 Transportadores intermediários	24
1.1.3 DNA mitocondrial e genoma mitocondrial	25
II. Desenvolvimento	28
2.1 Espécies Reativas do Oxigênio	28
2.2 Stress Oxidativo Mitocondrial	30
2.3 Defesa Celular Enzimática e Não Enzimática	33
2.3.1 Polimorfismo genético das enzimas	37
2.4 A morte celular por apoptose	38
2.4.1 A mitocôndria e a apoptose	40
2.4.2 O papel da p53 na apoptose	42
2.5 O Stress Oxidativo Mitocondrial e o cancro	44
2.6 Os Antioxidantes	47
2.6.1 Terapia antioxidante	47
2.6.2 Controvérsias ao uso de antioxidantes	49
III. Conclusão	54
IV. Bibliografia	56

Índice de Figuras

Figura 1 - Estruturas da Mitocôndria	16
Figura 2 – Estrutura do Complexo I	17
Figura 3 – O complexo II e o ciclo do ácido cítrico	18
Figura 4 – Estrutura do complexo III	19
Figura 5 – Estrutura do Complexo IV	21
Figura 6 – Esquema geral dos complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial	22
Figura 7 – Inibição do complexo I pela ação da rotenona	23
Figura 8 – Inibição do complexo III pela ação da antimicina	23
Figura 9 – Inibição do complexo IV pela ação do monóxido de carbono ou do cianeto	23
Figura 10 – Ação dos inibidores dos complexos da CRM	24
Figura 11 – Centros de ferro-enxofre	25
Figura 12 – Estrutura do DNA mitocondrial	26
Figura 13 – Reação de Fenton	29
Figura 14 – Reação de Harber-Weiss	30
Figura 15 – Formação de ROS e as defesas antioxidantes na mitocôndria	31
Figura 16 – Stress Oxidativo	32
Figura 17 – Causas que levam à formação de radicais livres	32
Figura 18 – Reações gerais das defesas antioxidantes	34
Figura 19 – Ciclo das reações do glutathione	35
Figura 20 – Modificações ao nível das enzimas antioxidantes	38
Figura 21 – Via dos receptores da morte	39
Figura 22 – Apoptose Mitocondrial	42
Figura 23 – Mecanismo de ação da proteína p53	44
Figura 24 – Relação entre a formação de ROS e o processo de carcinogénese	45
Figura 25 – Avaliação da incidência do cancro do pulmão em vários estádios em ratinhos K-RAS tratados com antioxidantes	51

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estudos que demonstram a eficácia de certos antioxidantes na prevenção do cancro

51

Lista de abreviaturas

AIF	Fator indutor da apoptose (apoptosis inductor factor)
APAF-1	Protease apoptótica activadora do factor 1 (Apoptotic protease activating factor 1)
ATP	Adenosina trifosfato (adenosine triphosphate)
Bak	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2
Bax	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2
CAT	Catalase
CDK	Proteína quinase ciclina dependente (Cyclin-dependent kinases)
CO₂	Dióxido de carbono
CRM	Cadeia respiratória mitocondrial
Cu²⁺	Ião cúprico
D-loop	Displacement loop
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAD	Dinucleótido de flavina-adenina
FADD	Proteína plasmática associada ao domínio de morte Fas (Fas-associated death domain)
FADH₂	Dinucleótido de flavina-adenina reduzida
Fe²⁺/Fe³⁺	Ião ferroso/ férrico
GSH	Glutationa na forma reduzida
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HC	Cadeia pesada do DNA mitocondrial (Heavy chain)
IAP	Inibidor da apoptose
LC	Cadeia leve do DNA mitocondrial (Light chain)
MEM	Membrana externa mitocondrial
MIM	Membrana interna mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
mTERF	Fator de transcrição de terminação mitocondrial
NADH	Nicotinamida-adenina dinucleótido reduzida
nDNA	Genoma nuclear
MOMP	Permeabilização da membrana externa mitocondrial
mtSSBP	Proteína estabilizadora da cadeia simples do DNA mitocondrial

NO	Óxido nítrico
O₂	Oxigénio molecular
O₂•-	Anião Superóxido
•OH	Radical hidroxilo
OXPPOS	Fosforilação oxidativa (oxidative phosphorylation)
Pb	Pares de bases azotadas
Pi	Fosfato inorgânico
POL_γ	Polimerase γ mitocondrial
Q	Ubiquinona ou Coenzima Q
•QH	Radical semi-ubiquinona
RNA	Ácido Ribonucleico
RNS	Espécies reativas do azoto (reactive nitrogen species)
ROS	Espécies reativas do oxigénio (reactive oxygen species)
rRNA	RNA ribossómico
SMAC	Segundo activador das caspases derivado da mitocôndria (Second mitochondria-derived activator of caspases)
TNF	Fator de necrose tumoral (Necrosis tumoral factor)
TRADD	Proteína associada ao domínio de morte do receptor TNF (TNF-receptor-associated- death domain)
tRNA	RNA transferência

I. Introdução

1.1 A Mitocôndria

1.1.1 Estrutura e funções

As mitocôndrias são organelos intracelulares fundamentais, que desempenham várias funções importantes, principalmente na respiração celular. Estão presentes na maioria das células eucarióticas e são responsáveis por produzir energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP) através do processo de fosforilação oxidativa (Hanson, 1989).

A respiração celular envolve a redução do oxigénio molecular (O_2) a água (H_2O) pela cedência de electrões provenientes da oxidação do NADH e do $FADH_2$ num sistema de complexos enzimáticos denominado de cadeia respiratória mitocondrial (CRM) ou cadeia transportadora de electrões (Beattie, 2007).

A mitocôndria (**Figura 1**) é constituída por duas membranas: a membrana externa e a membrana interna. O espaço entre as duas membranas chama-se espaço intermembranar. A membrana interna é a mais complexa, constituída por dobras denominadas de cristas e contém essencialmente proteínas. A membrana externa, lisa e esférica, é constituída por proteínas maioritariamente integrais, as porinas, e por lípidos. O espaço limitado pela membrana interna chama-se matriz mitocondrial onde estão os ribossomas, as proteínas e o DNA mitocondrial (mtDNA) (Scheffler, 2007).

Estes organelos além de desempenharem um papel relevante na respiração aeróbia, também participam na sinalização celular, destacando-se a regulação da permeabilidade da membrana e da morte celular por apoptose (Li & Dewson, 2015).

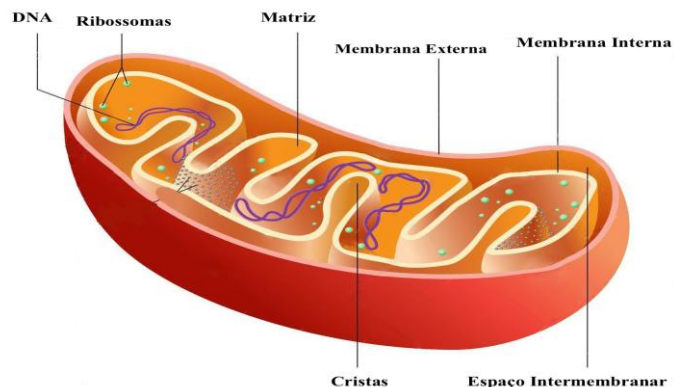


Figura 1 – Estruturas da mitocôndria. A mitocôndria possui duas membranas: a membrana interna e a membrana externa delimitadas por um espaço intermembranar. (Adaptado de <http://pt.dreamstime.com/fotografia-de-stock-royalty-free-mitoc-ndria-image31606337>).

1.1.2 Cadeia Respiratória Mitocondrial

A cadeia respiratória mitocondrial é composta por quatro complexos enzimáticos e é uma das etapas da síntese de ATP. Estes complexos são constituídos por enzimas que estão organizadas de acordo com o crescente potencial redox: a NADH desidrogenase (Complexo I), a succinato desidrogenase (Complexo II), a ubiquinol-citocromo c oxidorreductase (Complexo III) e a citocromo c oxidase (Complexo IV); e a ATP sintase. Os transportadores intermediários são a ubiquinona e o citocromo c (Quintas, 2008).

1.1.2.1. Complexo I – NADH: ubiquinona oxidorreductase (NADH Desidrogenase)

A NADH desidrogenase é uma enzima composta por aproximadamente 40 cadeias polipeptídicas diferentes, em que se inclui o FMN e pelo menos seis centros de Fe-S, 2 de 2Fe-2S e 4 de 4Fe-4S. O complexo insere-se na membrana interna da mitocôndria e tem a forma de L (**Figura 2**). O braço da matriz encontra-se perpendicular à matriz da mitocôndria, e o braço membranar perpendicular à membrana (Nelson & Cox, 2005).

A reação é dada pela reação 1:

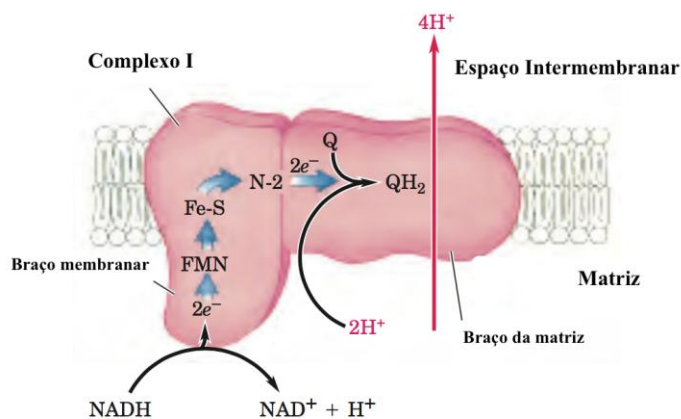


Figura 2 - Estrutura do Complexo I. (Adaptado de Nelson & Cox, 2005).

A flavoproteína é constituída pelo cofator enzimático FMN e por um centro de ferro-enzofre (Fe-S). Após o NADH se ligar à flavoproteína, ocorre a transferência de electrões para o FMN, reduzindo-o (Quintas, 2008).

Esta enzima bombeia 4 protões da matriz para o espaço intermembranar da mitocôndria, e reduz a coenzima Q (ubiquinona) através da transferência de dois electrões da cadeia dos centros de Fe-S para uma molécula de ubiquinona na membrana. A forma reduzida da ubiquinona (Q) é o ubiquinol, QH₂ (Nelson & Cox, 2005).

A reação geral do complexo é dada pela reação 2:



1.1.2.2 Complexo II – Succinato: ubiquinona oxidoredutase (succinato desidrogenase)

O complexo II é o segundo ponto da cadeia transportadora, e contém quatro subunidades proteicas; um cofactor, o dinucleótido de flavina e adenina (FAD); centros de Fe-S e um grupo heme. Localiza-se na face interior da membrana interna

mitocondrial e transfere dois electrões do succinato para a ubiquinona (Reação 3). Este complexo está envolvido no metabolismo aeróbio através da cadeia transportadora como também pelo ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico (Nelson & Cox, 2013). No ciclo de krebs, produz-se por ciclo 3 NADH, 1 FADH₂, 1 ATP e 2 CO₂ nas reações de descarboxilação oxidativa. A reação de oxidação do succinato a fumarato, catalisada pela enzima succinato desidrogenase, é uma das etapas do ciclo de Krebs (**Figura 3**). A succinato desidrogenase é uma enzima exclusiva deste ciclo, pois está ligada à membrana interna da mitocôndria (Quintas & Ascenso, 2008).

A oxidação do succinato dá origem a FADH₂ e a fumarato. Dois electrões são cedidos pelo succinato para o FAD. O FAD é reduzido a FADH₂ que transfere electrões para a ubiquinona através dos centros de Fe-S. Em simultâneo ocorre a redução da ubiquinona (Q) em ubiquinol (QH₂) (Nelson & Cox, 2013a).

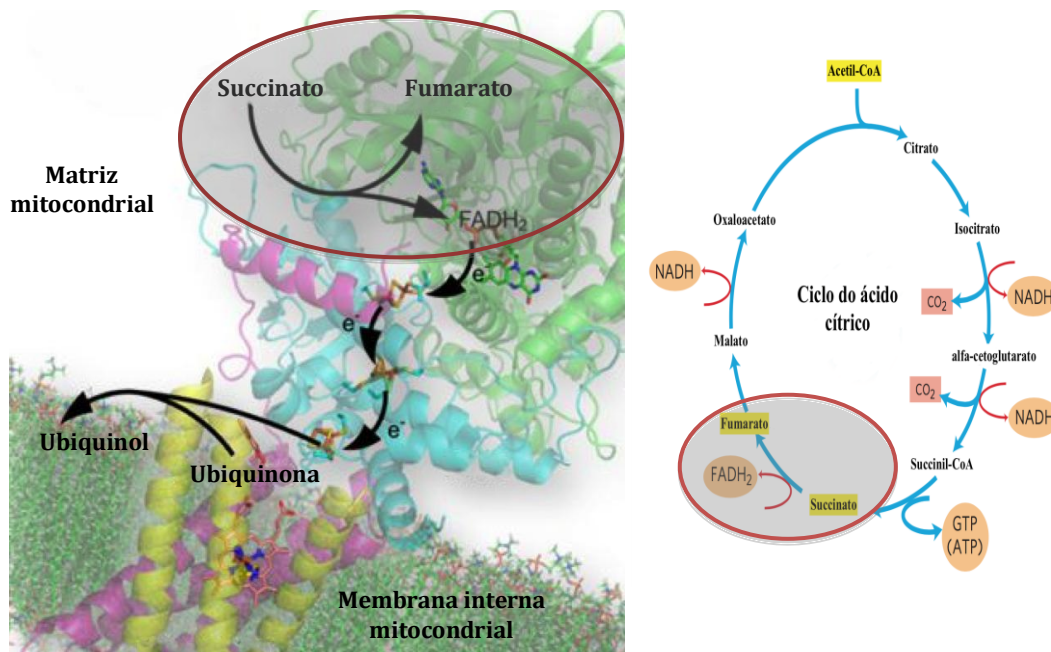
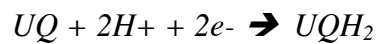
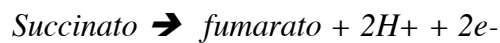
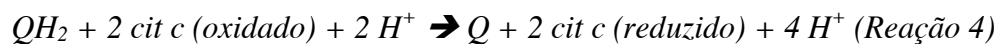


Figura 3 - O complexo II e o ciclo do ácido cítrico. (Adaptado de Nelson & Cox, 2013c, e adaptado de https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/97/Succinate_Dehydrogenase_1YQ3_Electron_Carriers_Labeled.png).

Neste complexo, não há bombeamento de prótons para o espaço intermembranar (Quintas, 2008).

1.1.2.3 Complexo III – Ubiquinol: citocromo c oxidorreductase

Este complexo também é conhecido pelo nome de complexo citocromo bc. Os centros redox são o citocromo b, o citocromo c1 e a proteína Fe-S de Rieske. Neste passo, ocorre a transferência de 2 elétrons entre a ubiquinona e os centros redox do citocromo (Beattie, 2007). Os citocromos são proteínas que contêm pelo menos um grupo heme fortemente ligado à proteína. Os íons de ferro pertencentes ao grupo heme tanto estão na sua forma oxidada (Fe^{3+}) como na sua forma reduzida (Fe^{2+}). O complexo catalisa (Reação 4) a oxidação do ubiquinol e a redução de 2 moléculas de citocromo c (Nelson & Cox, 2005b):



O QH_2 é oxidado a Q e as duas moléculas de citocromo c são reduzidas. Após aceitar o elétron proveniente do Complexo III no seu grupo heme, o citocromo vai doar o elétron ao Complexo IV (**Figura 4**) (Nelson & Cox, 2013a).

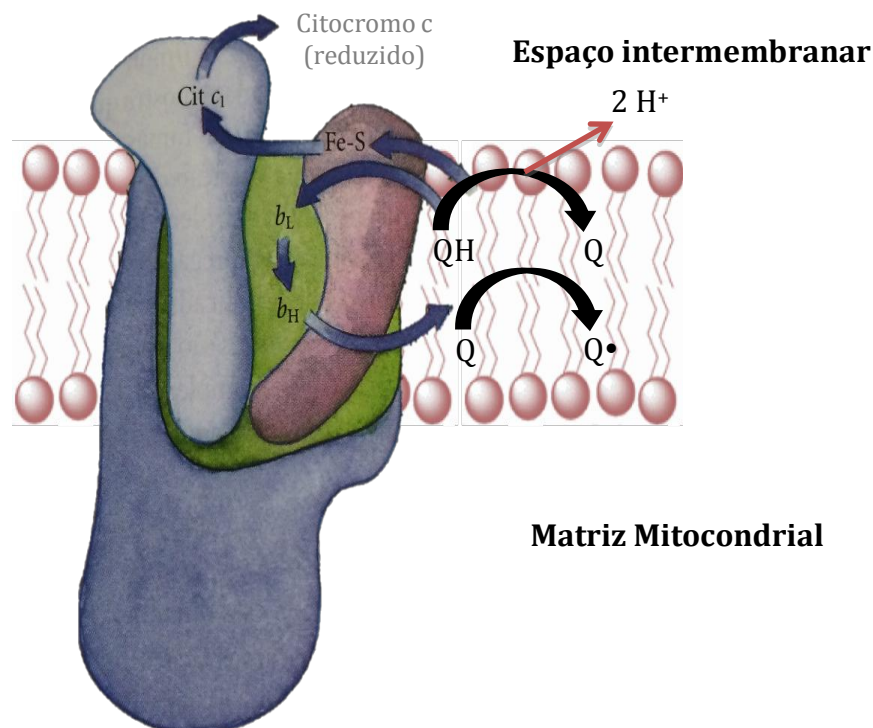


Figura 4 – Estrutura do complexo III. (Adaptado de Nelson & Cox, 2013).

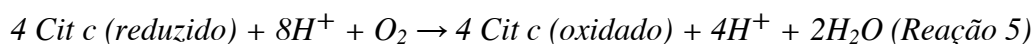
Neste complexo, ocorre o bombeamento de 4 prótons, sendo dois prótons para cada citocromo c reduzido (Quintas, 2008).

1.1.2.4 Complexo IV – Citocromo c: O₂ oxidorreductase

O Complexo IV é último da cadeia transportadora, transfere electrões do citocromo c para o O₂, aceitador final de electrões, reduzindo-o a H₂O (**Figura 5**).

A energia gasta na transferência de electrões é utilizada para o bombeamento de prótons. A redução de uma molécula de oxigénio requer 4 prótons para originar uma molécula de água juntamente com mais 4 que são bombeados (Nelson & Cox, 2005b).

A reacção 5 traduz o complexo IV:



Este complexo contém dois citocromos, a e a₃, e dois centros de cobre, Cu_A e Cu_B. A subunidade I está ligada aos dois grupos heme e também a um átomo de cobre (Cu_B), que juntamente com o heme a₃ forma um centro binuclear que aceita electrões do heme a para o oxigénio ligado ao heme a₃. A subunidade II contém dois átomos de cobre ligados por um grupo sulfidilo a resíduos de cisteína (Cu_A) e é onde se liga o citocromo c reduzido. A subunidade III disponibiliza o oxigénio para as subunidades I e II (Nelson & Cox, 2005b).

Em resumo, os electrões são transferidos do citocromo c reduzido para o Cu_A na subunidade II e de seguida para o heme a na subunidade I do complexo IV. São então deslocados para o centro binuclear, Cu_B e a₃, e finalmente para o oxigénio. No início dois electrões são transferidos para o oxigénio ligado ao centro binuclear, e forma-se um derivado do peróxido de hidrogénio (O₂²⁻). Os outros dois electrões são necessários para captar quatro prótons para formar H₂O. Os derivados do oxigénio, espécies muito reativas, formadas durante este complexo continuam sempre ligadas ao centro binuclear com o intuito de impedir que se libertem até que se produza a água (Nelson & Cox, 2013a).

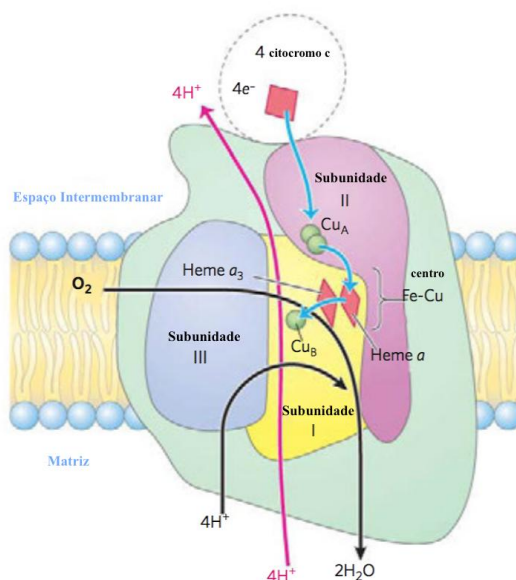


Figura 5 – Estrutura do Complexo IV. A transferência de electrões começa com a intervenção do citocromo c, que doa 2 electrões para o centro de Cu_A . Os electrões passam pelo heme α até ao centro Fe-Cu. O oxigénio liga-se ao heme α_3 e é reduzido a O_2^{2-} por 2 electrões do centro Fe-Cu; e posteriormente com a libertação de mais dois electrões do citocromo vai converter-se em duas moléculas de H_2O com um consumo de 4 prótons da matriz. (Adaptado de Nelson & Cox, 2013).

1.1.2.5 ATP Sintetase

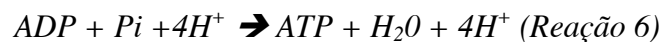
A ATP Sintetase catalisa a conversão de ADP em ATP através de um gradiente de prótons na membrana interna mitocondrial. A ATP Sintetase é constituída pelos complexos F1 e Fo. O complexo F1 é uma proteína periférica da membrana com uma porção hidrofílica e forma de bola; o complexo Fo é uma proteína integrada na membrana com uma porção hidrofóbica e forma de veio central; tendo em conjunto um aspeto de cogumelo (Nelson & Cox, 2013a).

O Fo é constituído por três subunidades: a, b e c. Estas subunidades dividem-se numa parte móvel, o rotor, e numa parte fixa, a escora. O rotor apresenta várias subunidades c, e a escora apresenta as subunidades b e c (Weber & Senior, 2003).

O F1 é constituído por nove subunidades, sendo a de maior relevância a subunidade γ . Esta subunidade vai ser a responsável pela associação entre o F1 e a subunidade b do Fo (Weber & Senior, 2003).

A ATP Sintetase permite a ligação do ADP ao fosfato inorgânico (Pi), a formação de ATP e a sua libertação (Quintas, 2008).

A reação geral (reação 6) do complexo traduz-se em :



O transporte de electrões ao longo da cadeia respiratória só é possível graças ao conjunto das enzimas que formam os complexos referidos acima. (**Figura 6**).

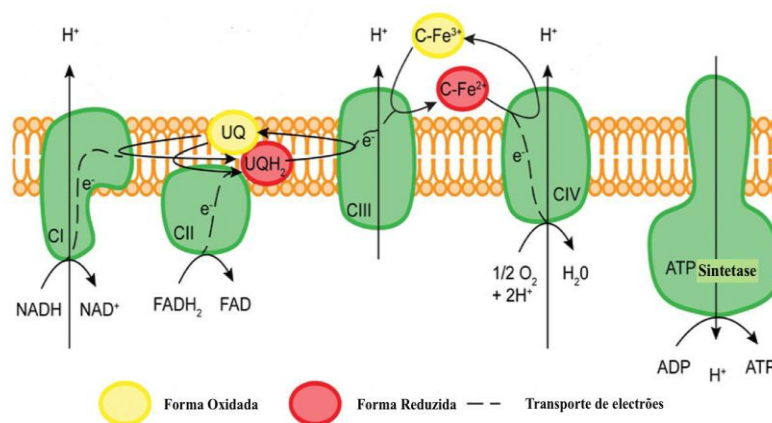


Figura 6 - Esquema geral dos complexos (I ao V) da Cadeira Respiratória Mitocondrial. (Adaptado de <https://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/fig5.jpg>).

1.1.2.6 Inibidores

O conjunto de complexos da CRM são independentes um dos outros. Este sistema transportador de electrões localizado na membrana interna, por vezes sofre a ação de inibidores. Os inibidores ligam-se a sítios específicos e bloqueiam o fluxo de electrões (Quintas, 2008).

São exemplos de inibidores: a rotenona, o malonato, a antimicina, o cianeto e o monóxido de carbono (Nelson & Cox, 2005b).

A rotenona (**Figura 7**) é um inibidor do complexo I, impede a transferência de electrões para a ubiquinona e consequentemente a redução desta.

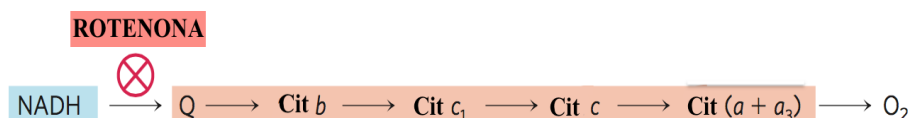


Figura 7 – Inibição do complexo I pela ação da rotenona. (Adaptado de Nelson & Cox, 2013).

O malonato inibe o complexo II por ter uma estrutura parecida ao succinato, pelo que há uma competição pelo centro ativo. O malonato ocupa então o lugar do succinato, inibindo o complexo (Quintas, 2008).

A Antimicina é responsável pela inibição do Complexo III (**Figura 8**) entre os citocromos b e c. Interrompe a transferência de electrões até ao O_2 (Nelson & Cox, 2005b).

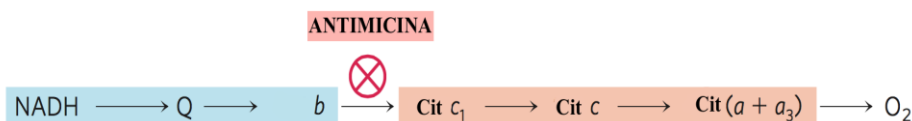


Figura 8 – Inibição do complexo III pela ação da antimicina. (Adaptado de Nelson & Cox, 2013).

O cianeto, a azida e o monóxido de carbono inibem o complexo IV (**Figura 9**). O cianeto e a azida ligam-se à forma oxidada do heme a_3 (Fe^{3+}) e bloqueiam a transferência de electrões do heme a para o centro binuclear. O monóxido de carbono liga-se à forma reduzida do heme a_3 (Fe^{2+}) e impede o transporte de electrões para o O_2 (Quintas, 2008).

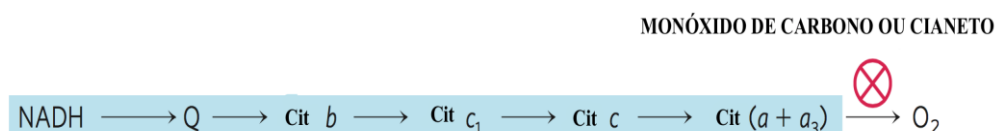


Figura 9 - Inibição do complexo IV pela ação do monóxido de carbono ou do cianeto. (Adaptado de Nelson & Cox, 2013).

A oligomicina bloqueia a transferência de electrões em qualquer um dos

complexos, por inibir a ATP sintase (Beattie, 2007).

A inibição de pelo menos um dos complexos é suficiente para parar a CRM por completo (**Figura 10**).

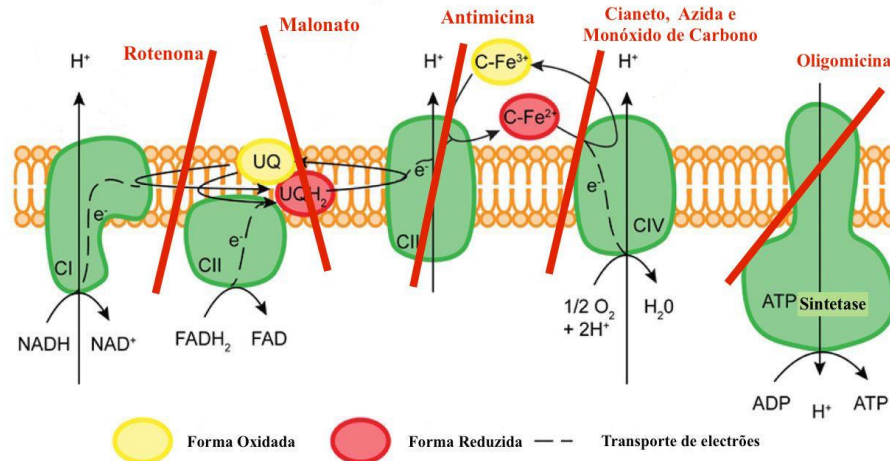


Figura 10 – Ação dos inibidores dos complexos da CRM: rotenona, malonato, antimicina, cianeto, azida, monóxido de carbono, e oligomicina. (Adaptado de <https://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/fig5.jpg>).

A inibição da cadeia vai influenciar a produção de energia durante a fosforilação oxidativa, colocando em causa a sobrevivência das células do organismo (Beattie, 2007).

1.1.2.6 Transportadores Intermediários

A ubiquinona é uma benzoquinona lipossolúvel que aceita um electrão transformando-se em semiquinona (QH) ou aceita dois transformando-se em ubiquinol. A molécula de CoQ difunde-se rapidamente pela bicamada lipídica da membrana mitocondrial interna por ser hidrofóbica. Permite o transporte de electrões entre os complexos I e II, e o complexo III. Por outro lado, pode originar espécies reativas do oxigénio com a interação entre o radical QH• e o O₂ (Nelson & Cox, 2013a).

Os citocromos são proteínas que estão ligadas ao grupo heme que contém ferro.

O ferro de um citocromo é alternadamente oxidado ou reduzido, ao contrário do que acontece com o da hemoglobina (Fe^{2+}). Os citocromos das mitocôndrias estão divididos em a, b e c. Os citocromos do tipo a e b são proteínas integrais da membrana interna da mitocôndria, já o citocromo c liga-se à superfície externa da membrana interna por forças electrostáticas. O citocromo c é um transportador móvel de electrões (Nelson & Cox, 2013a).

Nas proteínas de ferro-enxofre, o ferro encontra-se ligado a átomos de enxofre, ao contrário dos citocromos que está ligado ao grupo heme. O centros de ferro-enxofre (Fe-S) podem apresentar-se com apenas um átomo de ferro ligado a quatro grupos de resíduos de cisteína –SH (**Figura 11**) ou com mais do que dois átomos de ferro (Beattie, 2007).

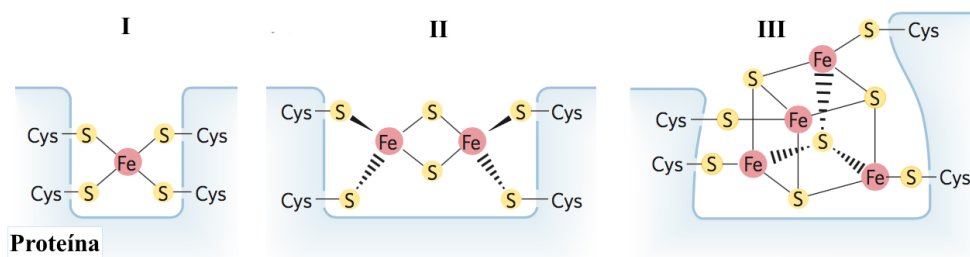


Figura 11 - Centros de ferro-enxofre. Estes centros podem conter um átomo de ferro (I), dois átomos de ferro (II), ou mais do que dois átomos de ferro (III). (Adaptado de Nelson & Cox, 2013).

1.1.3 DNA mitocondrial e genoma mitocondrial

O DNA mitocondrial humano (**Figura 12**) contém cerca de 16.539 pb. As mitocôndrias têm o seu próprio genoma, um DNA circular que codifica 2 RNAs ribossomais (rRNA), 22 RNAs transferência (tRNA) e 13 proteínas: 7 subunidades do complexo I da CRM, 3 subunidades do complexo IV, 2 subunidades do complexo V e o citocromo b (complexo III) (Ojala, Montoya, & Attardi, 1981). O mtDNA tem dupla cadeia; uma cadeia leve e uma cadeia pesada. A mitocôndria possui duas moléculas de mtDNA (Shokolenko & LeDoux, 2011). O DNA mitocondrial não possui intrões e encontra-se na matriz da mitocôndria próximo da cadeia respiratória mitocondrial. Como se encontra junto à CRM torna-se mais susceptível a danos oxidativos e a uma elevada taxa de mutação (Smith, 2015).

A integridade do DNA mitocondrial é crucial para o normal funcionamento da célula. Em células normais, existem entre 2-10 cópias de mtDNA por mitocôndria e cada célula humana pode conter 1000 a 10000 cópias de DNA mitocondrial. Defeitos no genoma mitocondrial podem levar ao aparecimento de patologias degenerativas, envelhecimento e cancro (Falkenberg, Larsson, & Gustafsson, 2007).

O mtDNA, como o DNA nuclear, também é replicado, transcrito e traduzido. A replicação e a transcrição dependem da DNA polimerase γ (POL γ) (Taanman, 1999).

A replicação tem origem na região D-loop (displacement loop) pela ação da POL γ na cadeia pesada, HC (heavy chain) replicando constantemente o mtDNA, que é estabilizado pelas proteínas que ligam cadeias de DNA simples mitocondrial, mtSSBP (mitochondrial single stranded binding-protein). A D-loop é uma região não codificante entre nucleótidos que contém um fragmento da cadeia pesada, que está ligada a uma cadeia complementar (Taanman, 1999). Quando se chega ao fim da cadeia pesada, a cadeia leve, LC (Light chain) é replicada em sentido contrário; tratando-se de uma replicação bidirecional (Schapira, 2006). Por ação da DNA ligase forma-se uma molécula de mtDNA idêntica à cadeia-mãe. A transcrição, é executada a partir de promotores e a cadeia pesada é transcrita no sentido oposto ao dos ponteiros do relógio (Taanman, 1999).

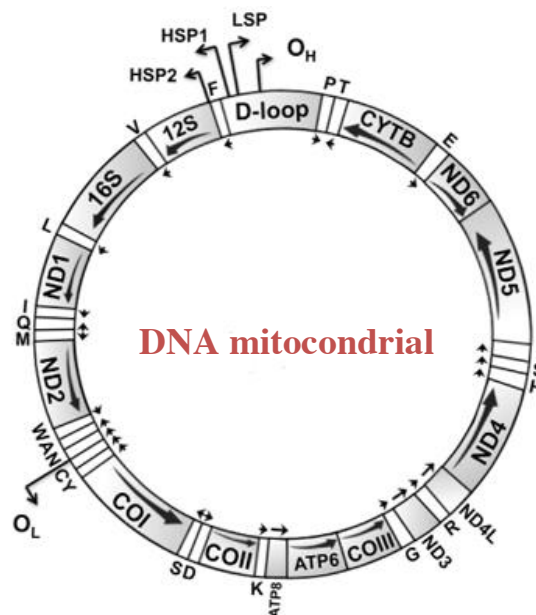


Figura 12 – Estrutura do DNA mitocondrial, com o mapa de genes. ND1-ND6 codificam as subunidades do complexo I; os genes COI,COII e COIII codificam subunidades da citocromo c oxidase, ATP6 e ATP8 codificam subunidades da ATP sintetase; e cyt b corresponde ao citocromo b do Complexo III da CRM. Os genes que codificam os dois rRNAs estão representados por 12S e 16S. (Adaptado de Shokolenko & LeDoux, 2011).

A expressão de genes na mitocôndria tem algumas características peculiares: os genes são todos expressos na mesma direção, ou seja, no sentido dos ponteiros do relógio; os genes dos RNA transferência estão localizados entre os genes que codificam os RNA ribossomais; não há intervalos entre os genes; não existem promotores entre os genes, pois as regiões codificantes de rRNA estão intervaladas pelos genes de tRNA; existe um único promotor na região D-loop, responsável pela transcrição que se inicia em frente ao gene 12S dá a volta ao ciclo e pára na região D-loop (Singh et al., 2005).

Na transcrição vai formar-se o mRNA a partir do DNA. Os genes são transcritos afim de garantir a tradução das 13 proteínas mitocondriais. O factor de terminação da mitocôndria, mTERF, vai-se ligar num local entre o 16S e o ND1 (Kruse, Narasimhan, & Attardi, 1989).

A tradução do DNA mitocondrial é semelhante à das bactérias. Os RNA transferência ligam-se aos aminoácidos correspondentes formando os complexos aminoacil-tRNAs. Estes complexos funcionam como adaptadores da síntese protéica e associam-se aos ribossomas e às mitocôndrias, sendo os péptidos sintetizados em 3 fases (Nelson & Cox, 2013b; Taanman, 1999):

- ✓ Modificação pós-transcrição
- ✓ Poliadenilação, pela polimerase poli(A)
- ✓ Processamento do RNA transferência

As mutações no genoma são alterações aleatórias na sequência de bases do DNA ou simplesmente alterações nas regiões codificantes de genes em que há alteração na proteína codificada. As mutações pontuais podem ser deleções, inserções e substituições de bases por outras. A taxa de mutação mitocondrial é maior do que a do DNA nuclear devido: o mtDNA não está envolvido por proteínas, não tem um sistema de reparação tão eficiente, e há produção de espécies oxidativas durante o processo de obtenção de energia que colocam em causa a integridade do material genético na mitocôndria (Belle, Piganeau, Gardner, & Eyre-Walker, 2005). Assim, o mtDNA essencial para a função normal da mitocôndria e a POL γ a única DNA polimerase ativa na mitocôndria e que pode replicar o mtDNA (Shokolenko & LeDoux, 2011).

II. Desenvolvimento

2.1 As Espécies Reativas de Oxigénio

A fosforilação oxidativa é a fase final na síntese de ATP onde ocorre a fosforilação de ADP em ATP. Para além da obtenção de energia, a cadeia respiratória/fosforilação oxidativa mitocondrial é responsável pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). Os radicais livres são espécies que apresentam um ou mais electrões não emparelhados, ou seja, possuem orbitais com apenas um electrão. Os radicais livres que derivam do oxigénio são chamados de espécies reativas do oxigénio (ROS) (Ferreira & Abreu, 2007).

Consideram-se três principais espécies reativas: o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($OH\bullet$). Estes três ROS primários causam diferentes efeitos celulares (Dakubo, 2010).

De uma forma geral, a adição de um electrão ao O_2 forma o anião superóxido, sendo produzido nas mitocôndrias, onde ocorre uma “libertação” contínua de electrões. Os electrões libertados na cadeia respiratória em vez de reduzirem o O_2 em moléculas de H_2O , reduzem-no a anião superóxido (Cadenas & Sies, 1998). O anião superóxido pode reduzir-se a peróxido de hidrogénio ou ser reduzido ao radical hidroxilo (Weidinger & Kozlov, 2015).

O anião superóxido é produzido essencialmente pelos complexos I e III, atua na regulação do processo inflamatório através da eliminação de corpos estranhos pelo sistema imunitário, e na regulação da síntese de citoquinas (Weidinger & Kozlov, 2015).

Os fagócitos possuem uma enzima denominada NADPH oxidase, responsável por catalisar a redução de um átomo de oxigénio dando origem ao anião superóxido. Este é utilizado na degradação de bactérias fagocitadas, sendo capaz de inativar algumas proteínas Fe-S das bactérias e gerar compostos responsáveis pelo combate a “invasores”, como é o caso do peróxido de hidrogénio e do peroxinitrito ($ONOO^-$) (Barreiros, David, & David, 2006).

O anião superóxido é convertido em peróxido de hidrogénio pela superóxido dismutase (SOD). A SOD interfere também com a sinalização celular. O peróxido de hidrogénio é capaz de ultrapassar facilmente as membranas celulares e dar origem ao radical hidroxilo. Este é utilizado na obtenção de ácidos hipohalogenados (ácido

hipocloroso) pelos fagócitos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos; no entanto são prejudiciais quando entram em contacto com moléculas biológicas (Barreiros et al., 2006).

O radical hidroxilo é obtido no organismo ou através da redução do peróxido de hidrogénio ou através da homólise da água por exposição a radiação ionizante (Barreiros et al., 2006). O radical hidroxilo tem maior poder oxidante que os restantes ROS e apresenta um tempo de semi-vida muito curto, sendo o que mais danos provoca principalmente ao nível do DNA (Halliwell & Gutteridge, 1990).

O H_2O_2 não é considerado um radical, mas dá origem ao radical hidroxilo (Reação 7). Esta reação, denominada de Fenton (**Figura 13**), envolve a participação de um metal de transição, o ião ferroso (Fe^{2+}) (Iwabuchi, Yoshimoto, Shigetomi, & Kobayashi, 2015).

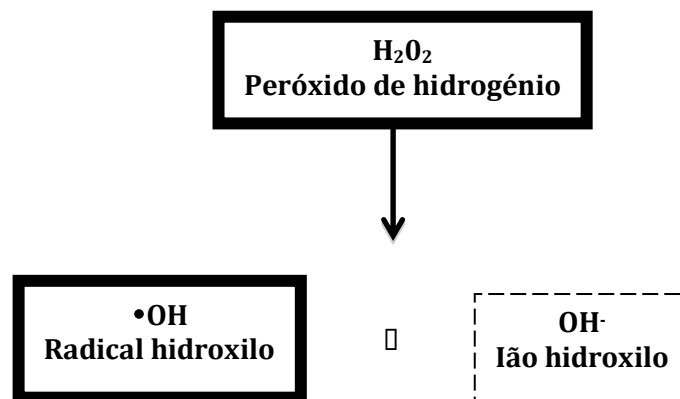
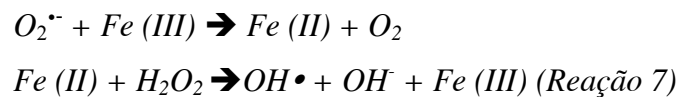


Figura 13 - Reação de Fenton. (Adaptado de Smith, Marks, & Lieberman, 2004).

Por outro lado, o anião superóxido pode interagir com outras moléculas e com o peróxido de hidrogénio, produzindo o radical hidroxilo, pela reação Haber-Weiss (Smith et al., 2004) (**Figura 14**).

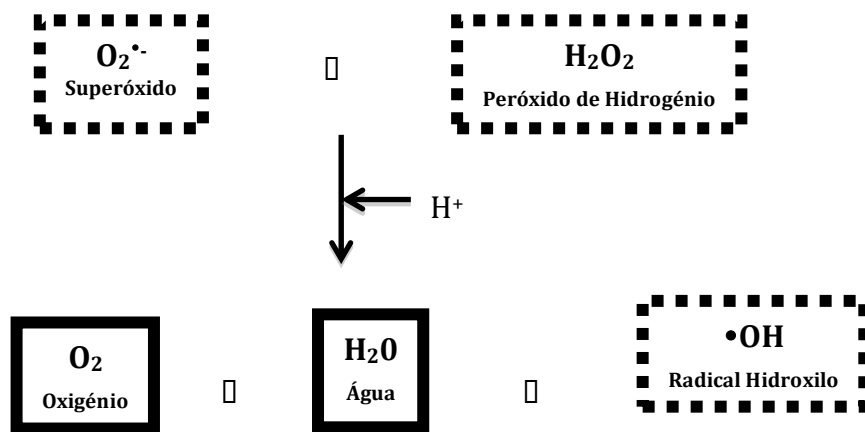


Figura 14 – Reação de Haber-Weiss. (Adaptado de Smith et al., 2004).

No entanto, os ROS também atacam o RNA, as proteínas, os lípidos e as membranas celulares (Barreiros et al., 2006). O ataque mais comum do radical hidroxilo é aos lípidos das membranas, estando na origem da peroxidação lipídica (Miguel & Cordero, 2012). A peroxidação lipídica trata-se de um processo de oxidação das membranas celulares e degradação dos lípidos levando à formação de um radical lipídico. De seguida, reage com uma molécula de oxigénio formando o radical lipoperoxilo (Ferreira & Abreu, 2007).

2.2 Stress Oxidativo Mitocondrial

O oxigénio é um elemento essencial à vida e necessário na obtenção de energia pela mitocôndria, contudo pode ser prejudicial em certas condições. Na respiração celular, o oxigénio é reduzido a água. Há uma pequena percentagem do oxigénio que não é reduzido e vai dar origem à formação de radicais livres. Uma vez produzidos grande parte dos radicais livres são removidos por mecanismos de defesa antioxidante da célula (**Figura 15**). Um equilíbrio entre a produção de radicais livres e a sua eliminação é essencial para o normal funcionamento do organismo (Ferreira & Abreu, 2007). Os ROS podem ter benefícios para a célula, em concentrações baixas a moderadas, participando em processos de sinalização e regulação celular. Já em excesso podem danificar o DNA, proteínas e lípidos celulares; provocando em diversos locais da célula danos oxidativos (Fridovich, 1999).

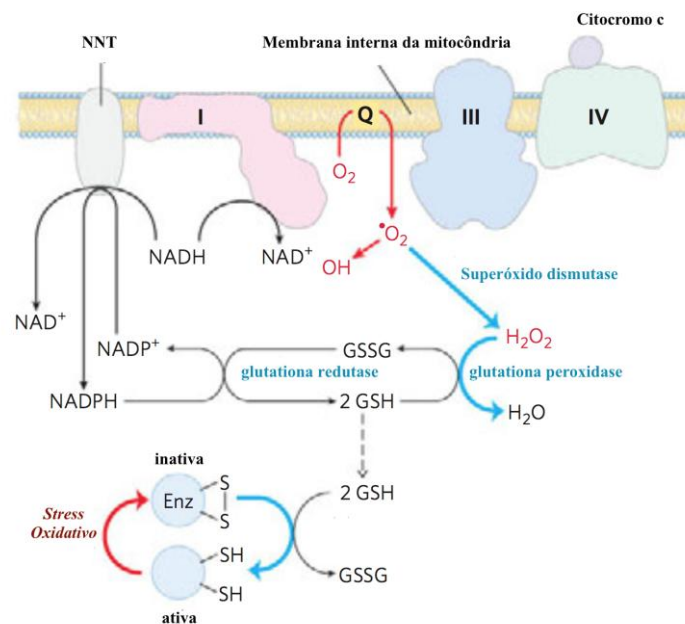


Figura 15 - Formação de ROS e a ação das enzimas antioxidantes na mitocôndria. (Adaptado de Nelson & Cox, 2013).

Os ROS:

- 1) inibem a correção de possíveis erros do RNA transferência, para formar a sequência funcional de aminoácidos da proteína, resultando na síntese de proteínas anômalas;
- 2) oxidam os aminoácidos cisteína e metionina alterando a estrutura e função das proteínas;
- 3) provocam modificações nas hélices do DNA, o que altera a expressão genética e favorece o aparecimento de possíveis patologias (Silva & Ferrari, 2011).

Quando este equilíbrio está a favor da produção de radicais livres, ocorre um desequilíbrio denominado de *stress oxidativo* (Ferreira & Abreu, 2007).

Segundo o bioquímico alemão Helmut Sies, *stress oxidativo* (**Figura 16**) é definido como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes, que potencialmente geram danos” (Sies, 1997).

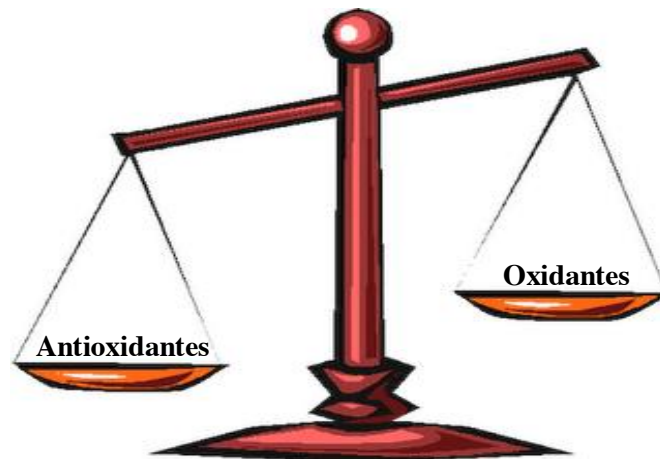


Figura 16 – Stress Oxidativo. Balança que ilustra o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes no stress oxidativo. (Adaptado de <https://vocevaientender.files.wordpress.com/2012/03/balanc3a7a.png>).

A produção destas espécies tem diversas causas naturais e não naturais. As causas naturais podem englobar processos de inflamação e prática de exercício físico intenso; enquanto que as não naturais (**Figura 17**) destacam-se a presença de compostos químicos estranhos ao organismo, os xenobióticos, e doenças (Lahance, Nakat, & Jeong, 2001).

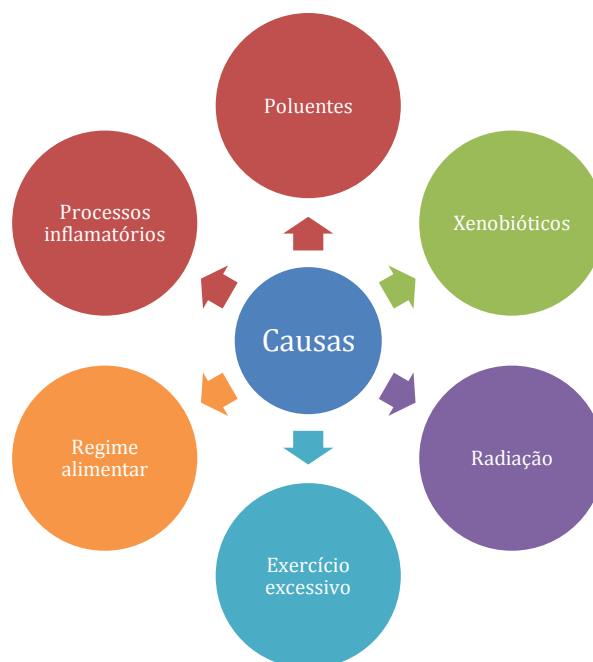


Figura 17 – Causas que levam a formação de radicais livres . (Adaptado de Ferreira & Abreu, 2007).

Uma forma de controlar esta produção elevada de ROS é melhorar a qualidade do regime alimentar com níveis adequados de antioxidantes; evitar comportamentos indutores de *stress oxidativo* como o álcool, o tabaco e a prática de exercício físico exagerado; a exposição a agentes poluentes e a xenobióticos (Lahance et al., 2001).

2.3 Defesa Celular Enzimática e Não Enzimática

A constante exposição diária do ser humano aos radicais livres, levou o organismo a desenvolver mecanismos de defesa para eliminar estes radicais e assim proteger-se. Estas defesas que mantêm o equilíbrio redox nas células podem dividir-se em enzimáticas e não enzimáticas. As defesas enzimáticas (**Figura 18**) mais relevantes são: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (Krishnamurthy & Wadhwani, 2012).

A superóxido dismutase é uma enzima extremamente eficiente que catalisa a conversão do superóxido em peróxido de hidrogénio, que de seguida transforma-se em água pela catalase nos lisossomas, ou pela glutatona peroxidase nas mitocôndrias (Krishnamurthy & Wadhwani, 2012).

Existe três formas de SOD que variam consoante o cofactor metálico: a forma citoplasmática, contém cobre e zinco no seu centro ativo, não sendo afectada pelo stress oxidativo; a forma mitocondrial, presente na mitocôndria, contém manganês no centro ativo e a sua atividade aumenta com o *stress* oxidativo; e a forma extracelular que possui os mesmos metais que a citoplasmática (Barreiros et al., 2006).

A SOD divide-se em:

- A SOD 1 (CuZnSOD), que é uma proteína dimérica e encontra-se no citoplasma;
- A SOD 2 (MnSOD), uma proteína tetramérica e localiza-se na mitocôndria;
- A SOD 3 (CuZnSOD) é uma proteína tetramérica extracelular (Kulbacka, Saczko, Chwilkowska, Choromańska, & Skońska, 2012).

A catalase encontra-se numa estrutura, o peroxixoma. A catalase converte em água e oxigénio, o peróxido de hidrogénio. Possui quatro cadeias peptídicas, cada cadeia liga-se a um grupo heme, e cada grupo heme contém um ião de ferro, sendo este a reagir

diretamente com o peróxido de hidrogénio. O grupo heme está presente em concentrações elevadas nos peroxissomas e em menor quantidade nas mitocôndrias e no citoplasma (Beattie, 2007).

A glutatona peroxidase é uma enzima que depende da glutatona reduzida (GSH) que sofre oxidação e converte-se em glutatona oxidada (GSSG). Por sua vez, a glutatona redutase regula os níveis de GSH e a ação da glutatona peroxidase, ao reduzir a GSSG em GSH através da oxidação do NADPH proveniente da via das pentoses (Kulbacka et al., 2012).

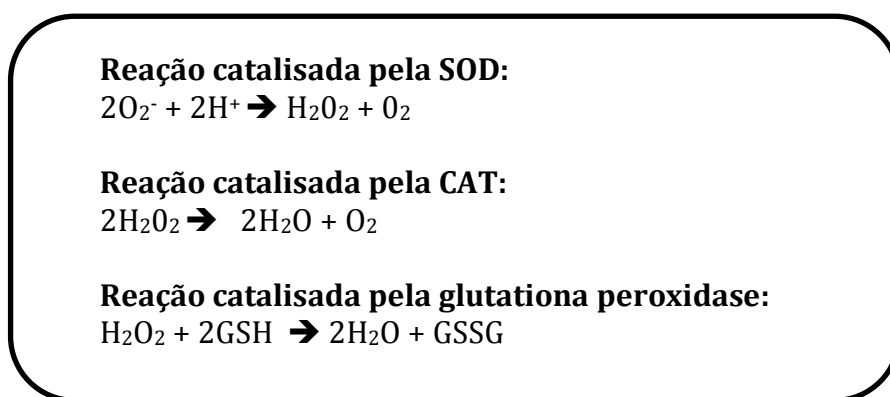


Figura 18 – Reações gerais da ação das defesas antioxidantes (Adaptado de Kulbacka et al., 2012).

Além das defesas de natureza enzimática, existem outras moléculas antioxidantes denominadas de não enzimáticas, que podem ser produzidas pela própria célula (glutatona na forma reduzida (GSH), coenzima Q, ácido úrico, o ácido lipóico e a bilirrubina) ou obtidas pela dieta (vitamina C, vitamina E, vitamina A, etc) (Barreiros et al., 2006).

O glutatona (**Figura 19**) é um tripéptido de baixo peso molecular e “scavenger” de radicais livres, atuando como cofator de enzimas antioxidantes anteriormente referidas, a glutatona peroxidase e a glutatona redutase. Durante o processo de destruição dos radicais livres, o glutatona é oxidado formando um radical reativo, o GS•. O GS• rapidamente reage com um outro radical GS•, dando origem a uma molécula, a glutatona dissulfeto (GSSG), não oxidante (Pastore, Federici, Bertini, & Piemonte, 2003).

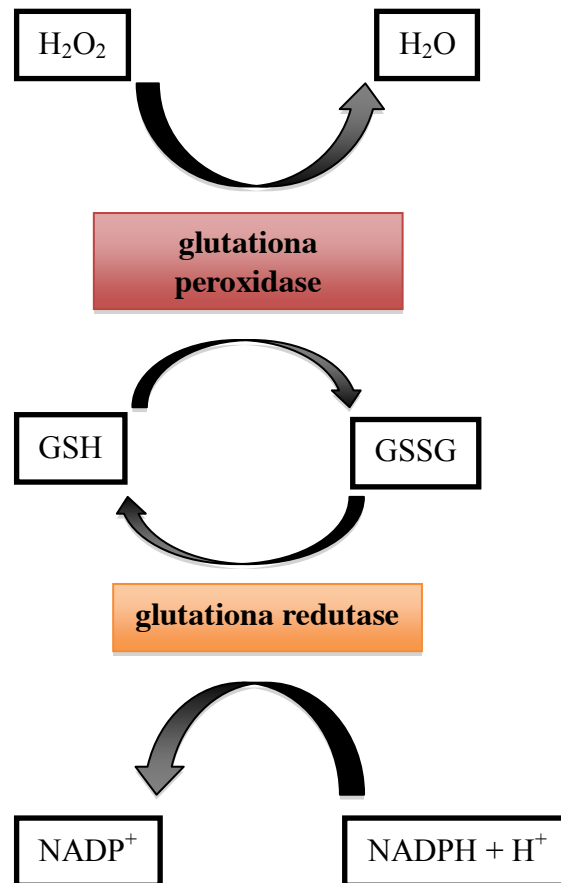


Figura 19 – Ciclo de reações do glutatona.

A coenzima Q, também conhecida como ubiquinona, encontra-se principalmente na membrana interna da mitocôndria, nas vesículas do complexo de Golgi e nos lisossomas. A principal função da ubiquinona rege-se principalmente ao nível da mitocôndria onde as desidrogenases transferem electrões para a ubiquinona; convertendo-a em ubiquinol (Krishnamurthy & Wadhvani, 2012). A oxidação do ubiquinol ocorre com a doação de um hidrogénio a um radical livre ou ao complexo III. A reoxidação leva à formação de ubiquinona com a inativação de dois radicais livres. A ubiquinona também é responsável por regenerar o tocoferol na forma reduzida (vitamina E) na membrana mitocondrial e reduz o nitrito a óxido nítrico (Barreiros et al., 2006).

O ácido úrico é um produto resultante do metabolismo das purinas pela ação da enzima xantina oxidase. A formação de ácido úrico é proporcional à quantidade de

enzima. As purinas degradam-se em hipoxantina, e posteriormente em xantina. A xantina converte-se em ácido úrico e urato de sódio. Encontra-se no sangue humano na forma de urato monossódico e é eliminado se necessário através da urina (Barreiros et al., 2006). O ácido úrico desempenha um papel antioxidante no plasma humano, funciona como “scavenger” de radicais livres e previne a peroxidação proteica (Duk-Hee Kang & Sung-Kyu Ha, 2014).

O ácido lipóico é uma molécula também denominada de α -ácido lipóico. A forma reduzida é o ácido dihidrolipóico. O ácido lipóico encontra-se de forma natural na mitocôndria e atua como coenzima da piruvato desidrogenase. É um antioxidante pois atua como “scavenger” de radicais hidroxilo de oxigénio; é um ótimo regenerador da vitamina C e E; reduz o NADPH oxidase; e aumenta a expressão mitocondrial das enzimas antioxidantes. Por ser tanto lipossolúvel como hidrossolúvel consegue atuar em qualquer parte do organismo; sendo um antioxidante endógeno e exógeno (Goraca et al., 2011).

A bilirrubina possui propriedades pró-oxidantes como também antioxidantes. Quando exerce um papel antioxidante, a bilirrubina encontra-se ligada à albumina sérica, reagindo com os radicais peróxido. Regenera a vitamina E (Larson, 1997).

A vitamina C ou ácido ascórbico é hidrossolúvel, ou seja, solúvel em água encontrando-se nos compartimentos aquosos dos tecidos humanos, nomeadamente fígado, no baço, nos rins. Geralmente, são absorvidas pelo intestino e transportadas através do sistema circulatório até aos tecidos onde vão ser utilizadas. Este tipo de vitaminas não são armazenadas no organismo, sendo o excesso excretado através da urina. Se estiver em deficiência, a absorção é máxima e não é eliminada pela urina (Romero, Hernández, Cerón, & Chavez, 2013). A vitamina C possui uma atividade antioxidante ao nível dos radicais livres formados, regenera a vitamina E; ou liga-se à glutatona reduzida, que tem a capacidade de restabelecer a atividade tanto da vitamina C como da vitamina E (Pérez-Matute, Crujeiras, Fernández-Galilea, & Prieto-Hontoria, 2012).

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel, solúvel em lípidos, encontra-se nas membranas celulares e desempenha um papel fundamental na proteção do organismo

contra os ROS formados metabolicamente ou pelo ambiente. Por se encontrar na parte lipídica das membranas, a vitamina E protege os fosfolípidos da peroxidação lipídica, mantendo a integridade da membrana celular (Pérez-Matute et al., 2012).

Quando há um ataque de espécies reativas forma-se um radical fenólico pouco reativo (vit E•). No entanto, a vitamina C reage com esse radical e regenera a vitamina E ao seu estado inicial. Os radicais tanto da vitamina C como da E não são espécies reativas do oxigénio, pois o electrão desemparelhado de cada um é energeticamente estável (Fang, Yang, & Wu, 2002). A vitamina E é constituída por quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, sendo o alfa tocoferol o mais ativo (Romero et al., 2013). De todos, o alfa tocoferol é o mais abundante nos tecidos e no plasma e o que possui maior atividade biológica. Atua como dador de hidrogénio ao radical peroxilo interrompendo a reação radicalar, evitando assim as lesões ao nível das proteínas e das bases azotadas do DNA (Fang et al., 2002).

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel e pode ser encontrada nos alimentos de origem vegetal como os carotenóides (Silva & Jasiulionis, 2014). Apresenta diversas formas: retinol, retinal, ácido retinóico e palmitato de retinol (Romero et al., 2013). Do grupo dos carotenóides, o beta caroteno é a maior fonte de vitamina A (Silva & Jasiulionis, 2014). A sua biodisponibilidade aumenta na presença de outros antioxidantes. Os carotenóides capturam o oxigénio molecular, reduzindo assim a oxidação do DNA responsáveis por doenças degenerativas como é o caso do cancro (Romero et al., 2013).

2.3.1 Polimorfismo genético das enzimas

Como foi anteriormente referido no **ponto 2.3**, as defesas antioxidantes protegem o organismo do stress oxidativo, no entanto isto só é viável se a enzimas estiverem funcionais. E se sofrerem alguma modificação ou se forem degradadas, o que vai alterar?

Todas as enzimas, incluindo as que estão envolvidas na defesa contra os ROS, podem sofrer alterações. Os polimorfismos genéticos são alterações genéticas (**Figura 20**)

decorrentes de mutações. Estes polimorfismos podem provocar defeitos nos genes que codificam as enzimas antioxidantes, como é o caso de deficiência enzimática (Gospodaryov & Lushchak, 2012).

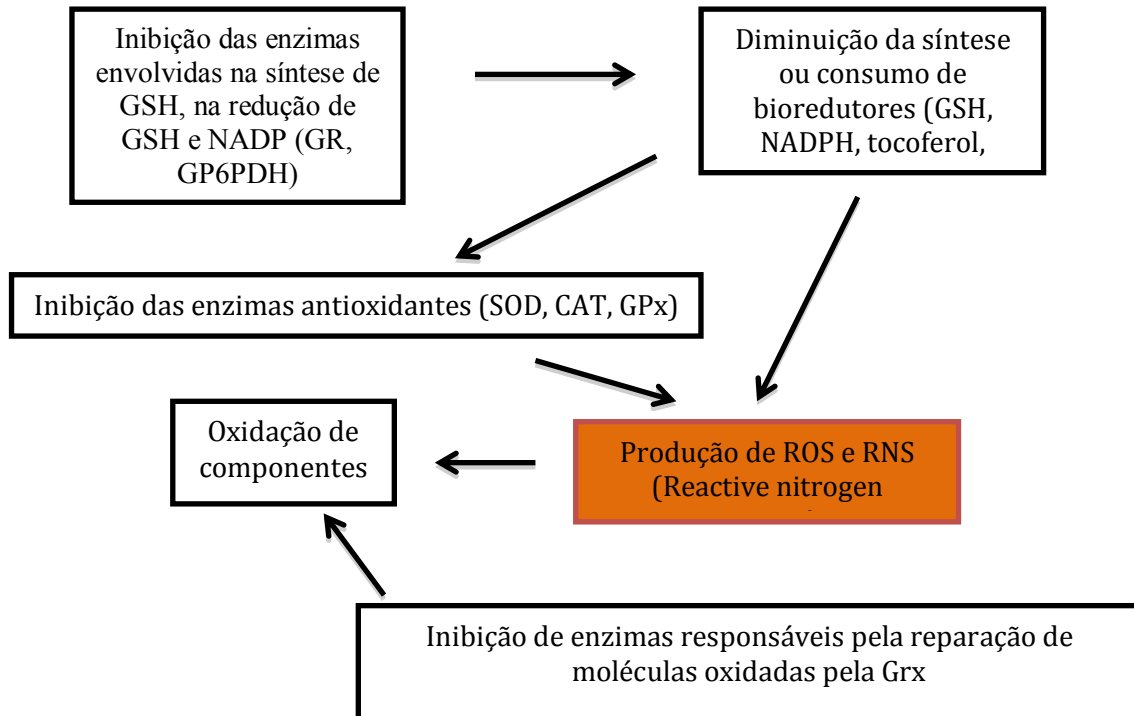


Figura 20– Modificações ao nível das enzimas antioxidantes que podem levar ao aumento da quantidade de ROS produzidos. Legenda: G6PD – glucose-6-fosfato desidrogenase; CoQH₂ – ubiquinol; Grx - glutaredoxina.(Adaptado de Gospodaryov & Lushchak, 2012).

A glucose-6-fosfato desidrogenase, G6PD, catalisa a primeira etapa da via das pentoses fosfato e produz NADPH. É uma enzima que mantém os níveis adequados de NADPH nas células, mas quando há um déficit relaciona-se com a produção do anião superóxido e do peróxido de hidrogénio (Gospodaryov & Lushchak, 2012).

2.4 A morte celular por apoptose

A morte celular programada ou apoptose caracteriza-se por um processo de autodestruição celular, que provoca alterações na membrana plasmática e no DNA. O DNA é fragmentado pela ação das endonucleases. Durante o processo, o citoplasma fragmenta-se e formam-se os corpos apoptóticos. Estes posteriormente vão ser fagocitados pelos macrófagos (Saikumar & Venkatachalam, 2013). A apoptose está relacionada com a manutenção da homeostasia do organismo e pode ser estimulada por

variadas situações incluindo lesões ao nível do material genético (DNA), células danificadas, entrada de células em fase S de uma forma descontrolada, e defesa contra microorganismos patogénicos (Nelson & Cox, 2005b).

A ativação das caspases (cysteine-aspartic proteases), as quais possuem especificidade para resíduos de ácido aspártico; é um ponto-chave para desencadear a apoptose. As caspases podem ser ativadas por duas vias principais: a via intrínseca ou via do receptor de morte (**Figura 21**) e pela via extrínseca ou via mitocondrial (Beattie, 2007). A via dos receptores de morte é iniciada quando ocorre a propagação de um sinal vindo do exterior da célula. O fator de necrose tumoral (TNF) liga-se a receptores específicos na superfície da membrana que estão em contacto com um domínio de morte. Esse domínio vai propagar o sinal de morte por proteínas plasmáticas, que é exemplo a proteína associada ao domínio de morte do receptor TNF, TRADD (TNF-receptor-associated- death domain) (Quintas, 2008). O domínio de morte Fas liga-se à proteína plasmática associada ao domínio de morte Fas, FADD (Fas-associated death domain), ativa a caspase 8 que vai atuar na mitocôndria. O citocromo c liga-se ao efetor da caspase 9, e promove a ativação da caspase 9. A caspase 9, por sua vez, vai estimular a degradação proteica e do DNA, culminando num processo apoptótico (Nelson & Cox, 2005b).

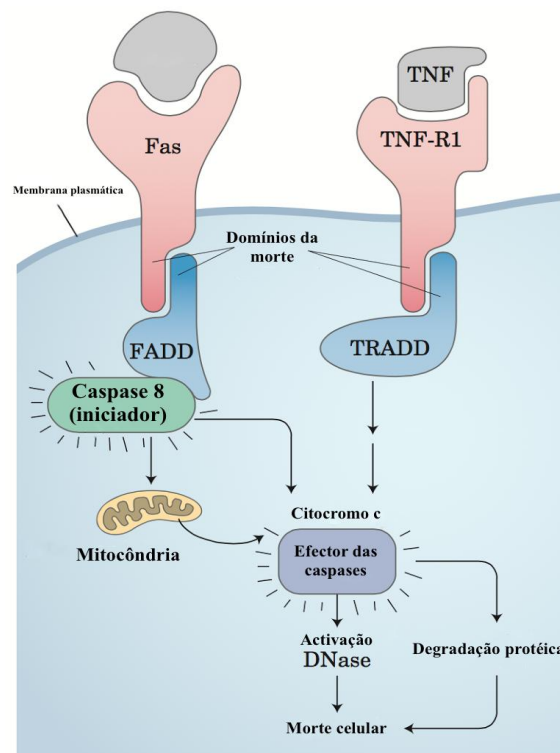


Figura 21 – Via dos receptores da Morte. Esta via inicia-se quando um ligando extracelular liga-se com o seu receptor de morte na membrana plasmática. (Adaptado de Nelson & Cox, 2005).

2.4.1 A mitocôndria e a apoptose

Vamos focar-nos apenas na via mitocondrial ou via intrínseca (**Figura 22**). Esta via controla a deslocação de certas proteínas por poros, como é o caso do citocromo c, num processo denominado de permeabilização da membrana mitocondrial externa, MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). O citocromo c é importante no transporte de electrões na cadeia transportadora entre os complexos III e IV, e na ativação das caspases (Gillies & Kuwana, 2014).

Os canais responsáveis pela a deslocação do citocromo c através da membrana abrem-se devido à ação da proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak (Li & Dewson, 2015). Uma vez no citoplasma, estas proteínas ligam-se à protease apoptótica ativadora do factor 1, APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) e à pró-caspase 9, formando um complexo heptamérico, o apoptossoma (Lopez & Tait, 2015). O apoptossoma vai activar a pró-caspase 9 em caspase 9, que é libertada e estimula uma cascata das caspases. Além do citocromo c, há outras proteínas que promovem o MOMP como é exemplo o segundo ativador das caspases derivado da mitocôndria, SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases), este pode ligar-se ao inibidor das proteínas da apoptose, IAP (Inhibitors of apoptosis proteins), activar a pró-caspase 3 em caspase 3 ou estimular a caspase 9. Já o fator indutor da apoptose e a endonuclease G entram no núcleo, degradam o DNA e estimulam a apoptose (Gillies & Kuwana, 2014). O fator indutor da apoptose, AIF (Apoptosis inducing factor) é uma proteína que causa a fragmentação do DNA e condensação da cromatina, atua como uma NADH oxidase e regula a permeabilidade da membrana mitocondrial na apoptose . A endonuclease G, passa da mitocôndria para o núcleo para promover a degradação do DNA (Nelson & Cox, 2005b).

A família de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) é outro tipo de proteínas que atuam na regulação da integridade da membrana mitocondrial externa. O BCL-2 é um proto-oncogene encontrado nos linfomas não Hodgkin que produz a proteína Bcl-2, inibidora da apoptose (Lopez & Tait, 2015).

A família divide-se em subfamílias: a subfamília de proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak), a subfamília de proteínas pró-apoptóticas de domínio BH3 (Bid, Bad) e a subfamília de proteínas anti-apoptóticas de Bcl-2 (bcl-2, bcl-xl) (Lopez & Tait, 2015).

A Bax e a Bak são proteínas chave na apoptose, sem elas as células ganhariam resistência à maioria dos estímulos apoptóticos. Nas células normais, a Bax desloca-se do citoplasma para a membrana externa da mitocôndria durante a morte celular programada no intuito de participar na destruição membranar, enquanto que a Bak localiza-se mesmo na membrana (Chipuk, Moldoveanu, Llambi, & Parsons, 2011).

Durante o stress apoptótico, para que ocorra a ativação da Bak e a Bax é necessário que haja interações com as proteínas de domínio BH3, originando alterações conformacionais em ambas (Li & Dewson, 2015).

Esta ativação é explicada com base em dois modelos diferentes: o modelo direto e o modelo indireto.

O modelo direto defende que certas proteínas de domínio BH3 denominadas de ativadoras (Bim e tBid), podem ligar-se diretamente a Bax e a Bak e promover a sua ativação. As restantes proteínas deste grupo são denominadas de “sensibilizadoras” (Pflaum, Schlosser, & Muller, 2014).

Já o modelo indireto defende que se todas as proteínas anti-apoptóticas de bcl-2 forem degradadas pelas proteínas de domínio BH3, o processo de apoptose é ativado mesmo sem a presença de ativadores (Gillies & Kuwana, 2014).

As proteínas inibidoras da apoptose, como a bcl-2 e a bcl-xl, impedem que ocorra a permeabilização mitocondrial e a apoptose, quer quando se ligam às proteínas de domínio BH3, impedindo-as de se ligarem a proteínas pró-apoptóticas, quer quando se ligam diretamente a Bax e a Bak, impedindo-as de se associarem e abrirem os canais da membrana que são responsáveis pela passagem do citocromo c (Lopez & Tait, 2015).

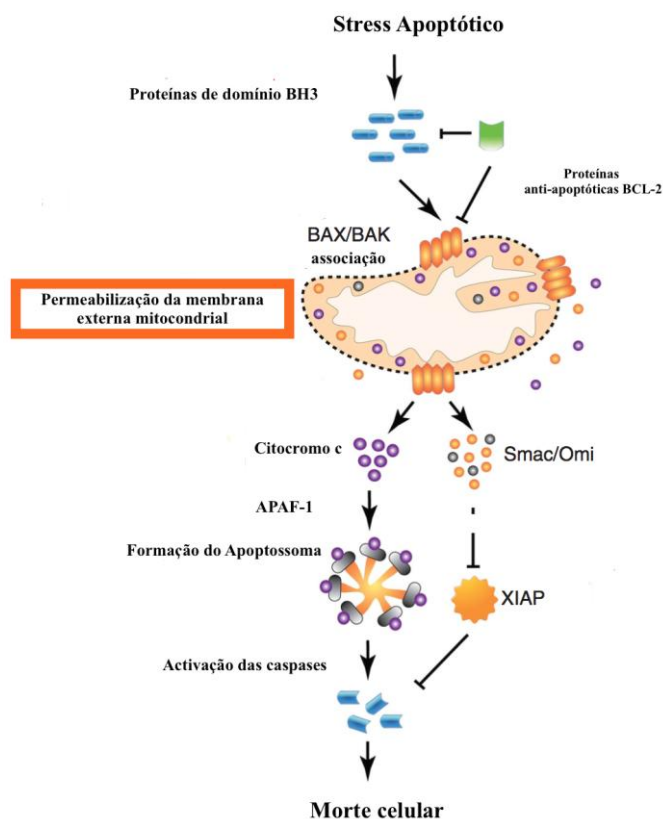


Figura 22 - Apoptose Mitocondrial. Durante o stress apoptótico, ocorrem interações entre as proteínas de domínio BH3 e a associação de Bax/Bak, que são proteínas pró-apoptóticas. Estas vão abrir canais na membrana afim de permitir a passagem de citocromo c para o citoplasma. No citosol, liga-se a APAF-1 formando o apoptossoma que resulta na activação das caspases; enquanto que o SMAC e o Omi neutralizam o inibidor das caspases (XIAP). (Adaptado de Lopez & Tait, 2015).

2.4.2 O papel da p53 na apoptose

Nas últimas décadas tem-se estudado o papel da apoptose na prevenção de doenças degenerativas, principalmente no cancro. O cancro é a proliferação anormal de células no organismo humano. As células crescem e dividem-se para originar novas células, no entanto elas também envelhecem e morrem dando lugar a células novas. Por vezes, este processo pode-se descontrolar e originar células em excesso, formando um tumor (Novakovi, Jovi, & Gruji, 2015). Caso o tumor seja maligno, dá origem a o cancro. O principal objectivo do tratamento desta doença é matar as células cancerígenas. A indução seletiva da morte celular através de fármacos antineoplásicos tem sido a estratégia mais utilizada (Marquez, Tsao, Faust, & Xu, 2013).

A relação entre a divisão celular e a apoptose é um fator crítico no desenvolvimento de cancro. Os proto-oncogenes são genes que codificam proteínas que promovem a divisão celular ou a resistência à apoptose. São exemplos de proto-oncogenes: genes de fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, proteínas quinases da cascata MAPK e fatores de transcrição (Beattie, 2007). Os genes supressores de tumores codificam proteínas que controlam a divisão celular. Mutações neste tipo de genes pode levar à formação de tumores onde os proto-oncogenes são transformados em oncogenes que se transformam em células cancerosas. Quando ocorrem mutações, os genes supressores de tumores têm que perder a sua atividade e a p53 responsável pela apoptose fica inativa na maioria das células cancerígenas. A proteína do retinoblastoma, a pRb também é um supressor de tumor uma vez que captura os fatores de transcrição E2F e inibe a entrada na fase S (Nelson & Cox, 2013a).

O fator de transcrição apoptótico p53 (**Figura 23**) é uma proteína citoplasmática reconhecida como a “guardiã do genoma” (Kulbacka et al., 2012).

Os níveis desta proteína são controlados pelos factores de transcrição E2F ou Myc durante o ciclo celular. Para além de sintetizarem proteínas com funções específicas nas fases G1 e S da divisão celular, estes factores também levam a célula à morte quando a divisão celular está comprometida (Kulbacka et al., 2012).

Quando ocorrem danos no DNA, a p53 é ativada e desencadeia um conjunto de reações no intuito de ativar proteínas de reparação do material genético ou induz diretamente a morte celular se as lesões forem irreversíveis. A p53 ativa a p21, inibidor das CDK (proteínas que regulam o ciclo celular). A p21 vai interromper o ciclo celular em G1 e vai impedir a entrada na fase S (Pflaum et al., 2014). A fase S é uma fase crítica que decide se a célula continua a dividir-se ou se leva a célula à morte.

A p53 induz a apoptose através da transcrição de proteínas pró-apoptóticas bcl-2 e ativação da Bax, com o intuito de se ligar à membrana mitocondrial. No citosol, a p53 forma complexos com inibidores da apoptose, bcl-xl e bcl-2, que conduzem à permeabilização da membrana mitocondrial e à libertação de citocromo c (Pflaum et al., 2014).

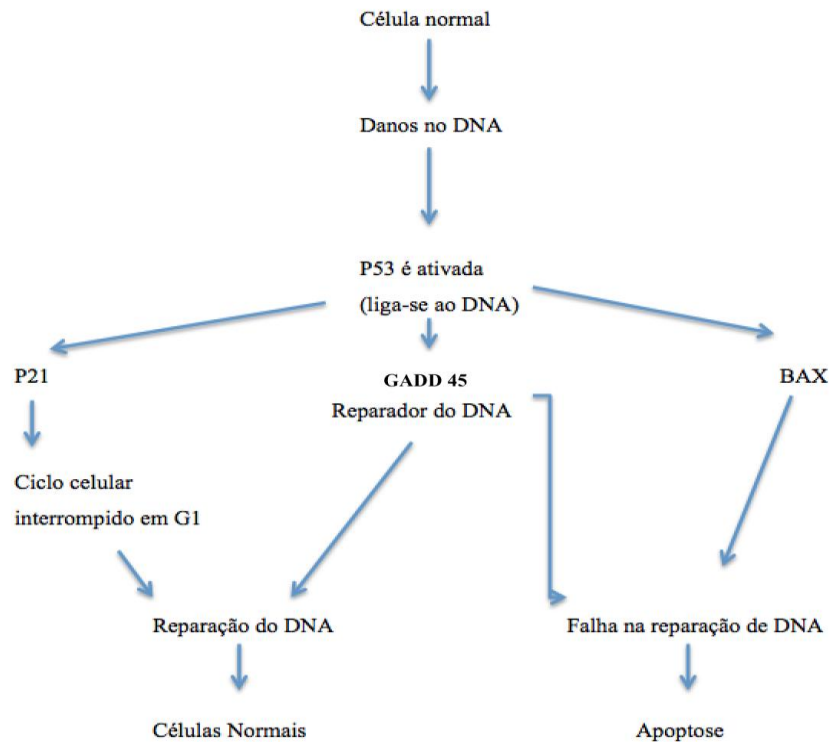


Figura 23 – Mecanismo de ação da proteína P53. (Adaptado de Pflaum et al., 2014).

Quando ocorre uma lesão genética no DNA pertencente ao grupo de genes GADD45, a proteína GADD45A é ativada pela p53. Esta proteína está envolvida na regulação de funções celulares, o controlo do ciclo celular e a reparação do DNA (Tamura, Vasconcellos, Sarkar, Libermann, & Zerbini, 2012).

2.5 O Stress Oxidativo Mitocondrial e o Cancro

Como já foi referido anteriormente no **ponto 2.1**, o stress oxidativo caracteriza-se por um desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS), e as defesas antioxidantes. Estas espécies reativas interferem com mecanismos essenciais do organismo como a via de transdução do sinal, que regula o crescimento celular e o estado redox (oxidação-redução) (Miguel & Cordero, 2012).

O stress oxidativo tem sido relacionado com algumas doenças, incluindo a carcinogénese (**Figura 24**). A proliferação celular pode ser estimulada por mutações

derivadas da oxidação de ácidos nucleicos, enquanto que a oxidação de certas proteínas danifica as células (Gospodaryov & Lushchak, 2012).

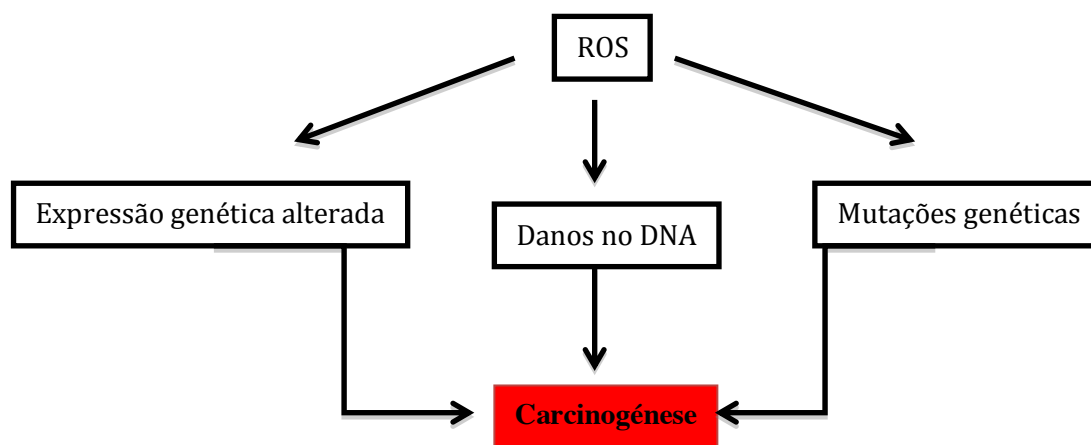


Figura 24– Relação entre a formação de ROS e o processo de carcinogénese. (Adaptado de Klaunig, Kamendulis, & Hocevar, 2010).

A carcinogénese caracteriza-se por ser um processo *multistep*, que transforma uma célula normal numa célula maligna: iniciação, promoção, progressão e metástases. Na fase inicial, ocorre uma mutação do DNA, que produz uma alteração na célula procedida de síntese de DNA, “fixando” a mutação. A célula pode parar a divisão celular, para tentar reparar a lesão (Klaunig et al., 2010). A fase de promoção caracteriza-se pela expansão das células mutadas na fase inicial, estimulando a proliferação celular e a inibição da apoptose dando origem a uma lesão. No entanto, esta lesão é reversível. Na progressão, última fase da carcinogénese, ocorrem alterações celulares e moleculares formando-se uma neoplasia. Esta fase é irreversível e provoca a malignidade da célula (Miguel & Cordero, 2012).

Ao comparar uma célula normal com uma célula cancerígena, a segunda tem duas propriedades que a distingue: divisão celular descontrolada e resistência à apoptose. No entanto, as células cancerígenas também induzem a angiogénese, têm capacidade metastática e apresentam capacidade de se dividir indefinidamente (Silva & Jasiulionis, 2014). A angiogénese dá origem ao crescimento de novos vasos sanguíneos nos tecidos, que fornecem oxigénio e nutrientes necessários à sobrevivência do célula maligna. A metastização é a formação de uma nova lesão cancerígena em múltiplos locais do organismo disseminada pela corrente sanguínea. A capacidade da célula se dividir indefinidamente é denominada de imortalidade celular (Schultz, 2007).

As mitocôndrias são o principal local de produção de ROS, sendo portanto o DNA mitocondrial o mais predisposto à ação destes (Dakubo, 2010). As mitocôndrias têm a capacidade de replicar o seu próprio DNA e possuem uma alta taxa de mutação verificando-se uma baixa eficiência na reparação de erros no material genético. As mutações no genoma mitocondrial interferem com a cadeia respiratória mitocondrial e com a síntese de ATP (Tokarz & Blasiak, 2014). É conhecido que a mitocôndria está envolvida na carcinogênese (Miguel & Cordero, 2012). Por serem metabolicamente muito ativas, as células cancerígenas necessitam de ATP constantemente. A integridade do mtDNA é muito importante. Lesões no mtDNA podem trazer graves consequências, sendo de extrema relevância as seguintes etapas: replicação do mtDNA, reparação de erros e degradação:

- ❖ Replicação – A replicação do DNA mitocondrial difere da do DNA nuclear no que se refere ao ciclo celular, podendo ocorrer em qualquer fase do ciclo. A DNA polimerase γ é a enzima responsável pelo processo de replicação (Shokolenko & LeDoux, 2011).
- ❖ Reparação do DNA – este processo protege o genoma de lesões que conseqüentemente podem levar a mutações nocivas. O DNA pode sofrer oxidação das bases e erro no emparelhamento das bases. Uma vez localizado o erro, são “enviadas” moléculas específicas ao local para proceder à sua reparação através excisão de bases (BER- base excision repair), excisão de nucleotídeos (NER-nucleotide excision repair) ou reparo de mau emparelhamento (MMR-mismatch repair) (Martin, 2011).
- ❖ Degradação de DNA – Quando o DNA mitocondrial possui diversas lesões que já se consideram irreversíveis a única solução é a degradação do mesmo e previne-se assim a mutagênese. Esta degradação fica a cargo da endonuclease G. (Martin, 2011).

Contudo, nem sempre a manutenção da integridade do DNA mitocondrial é um sucesso. Se a taxa de lesões for superior à capacidade de reparo, a acumulação de lesões gera mutações que pode resultar em apoptose ou no aparecimento de cancro (Martin, 2011).

Como já foi mencionado anteriormente no **ponto 2.1**, os ROS provocam lesões no DNA e os agentes carcinogêneos produzem lesões nas células. Algumas vitaminas e outros elementos atuam no sentido de contrariar estes radicais (Abdulla & Shukla, 2014). Quando o stress oxidativo aumenta, ocorrem alterações ao nível do genoma mitocondrial que vai dar origem a mutações. Essas mutações alteram as sequências codificantes, o número de cópias do mtDNA, a região displacement-loop (D-loop), uma região não codificante que participa no reparação do DNA. Estas alterações vão provocar uma mudança na cadeia respiratória mitocondrial com falha no transporte de electrões, conduzindo a uma produção crescente de ROS. A constante repetição deste ciclo, acumula mutações, que se tornam irreversíveis e posteriormente levam à formação de células pré-cancerosas, por inibição da apoptose (Tokarz & Blasiak, 2014).

2.6 Antioxidantes

Nos últimos anos, tem-se estudado inúmeras estratégias para combater o stress oxidativo. Os antioxidantes são moléculas capazes de retardar a lesão oxidativa, consequência da ação dos radicais livres. A terapia antioxidante baseia-se numa dieta rica em micro e macronutrientes com propriedades antioxidantes ou na toma de suplementos com componentes antioxidantes (Pérez-Matute et al., 2012).

2.6.1 Terapia Antioxidante

O tratamento mais utilizado atualmente no cancro é a destruição das células cancerosas que consequentemente também destrói células saudáveis/normais. É conhecido que a alimentação é um factor de risco no desenvolvimento de cancro no organismo humano (Abdulla & Shukla, 2014). Existem estudos que comprovam que a ingestão de antioxidantes ajuda na eficácia do tratamento como também na atenuação dos efeitos secundários.

Os antioxidantes podem atuar (Trinidad, Gutiérrez, Orozco, & Orozco, 2013):

- Bloqueio do cancro – proteção das células contra a oxidação; impedindo a proliferação de células cancerígenas,
- Supressão do Cancro – Inibição da progressão após a formação de uma pré-neoplasia.

Assim sendo, os antioxidantes presentes na alimentação assumem uma enorme importância na proteção do organismo humano contra o stress oxidativo. Os fitoquímicos são compostos encontrados em sementes, folhas, frutos, raízes, cereais ou vegetais; que possuem benefícios para a saúde (Miguel & Cordero, 2012). Quando os níveis de defesas antioxidantes sofrem variações em contacto com oxidantes, o organismo tem de restabelecer essas defesas através do consumo de antioxidantes naturais nos alimentos ou em suplementos vitamínicos (Abdulla & Shukla, 2014).

Os fitoquímicos são substâncias presentes nos alimentos de origem vegetal com propriedades antioxidantes e dividem-se em carotenóides, compostos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides, alcalóides, compostos azotados, e compostos organosulfurados (Ferreira & Abreu, 2007).

Os mais estudados são os compostos fenólicos e os carotenóides. Os compostos fenólicos são os que se encontram mais frequentemente nos vegetais, que inibem a peroxidação lipídica. A oxidação lipídica é inibida por “scavengers” de radicais livres que é o caso do butil-hidroxi-tolueno (BHT) (Novaes, Silva, Achkar, & Vilegas, 2013).

Os chás são fonte de catequinas, um dos tipos de flavonoides pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos. Os efeitos dos polifenóis do chá são: bloqueio dos radicais superóxido e hidroxilo, e diminuição da concentração sérica de malondialdeído (MDA), biomarcador do stress oxidativo (Grotto et al., 2008).

Os cogumelos também são fonte de compostos fenólicos, assim como as uvas, nozes, os morangos e as maçãs (Achkar, Novaes, José, & Silva, 2013) .

As uvas contém maioritariamente flavonoides, tendo as uvas pretas maior percentagem. O resveratrol é um polifenol encontrado na pele das uvas, que ativa a SIRT1, um regulador celular do stress. Regula também a proliferação celular de tumores ao interferir com as fases da carcinogénese pelas via de sinalização celular. O resveratrol está presente no vinho (Pérez-Matute et al., 2012).

Os carotenóides têm a capacidade antioxidantes, inativam os radicais livres. Reagem com estes e formam radicais estáveis devido à disponibilidade de electrões livres ao longo da sua cadeia (Ferreira & Abreu, 2007).

Como já foi referido no **ponto 2.3**, são também grandes antioxidantes: a vitamina E e a vitamina C. Estas vitaminas estão presentes em diversos alimentos.

A vitamina C encontra-se presente nos frutos cítricos e nos vegetais, em maioria nas laranjas, limões, limas, uvas, nos tomates, bróculos e nos espinafres.

A vitamina E está presente nos óleos vegetais, no farelo de arroz, na gema do ovo, em amêndoas, avelãs, no frango, no peixe ou na manteiga.

A vitamina A está presente no leite, queijo, gema de ovo, nas cenouras, nos espinafres, nas batatas ou nos frutos vermelhos (Romero et al., 2013).

Os antioxidantes podem não ser só provenientes da alimentação, sendo obtidos também por suplementos. No entanto, estudos demonstraram que os antioxidantes provenientes da alimentação são mais eficazes do que por intervenção farmacológica (C. T. Silva & Jasiulionis, 2014).

2.6.2 Controvérsias ao uso de antioxidantes

Os antioxidantes têm a capacidade de proteger o organismo contra os radicais livres e de poder prevenir o aparecimento de cancro a longo prazo.

No entanto, caso já possua um tumor, os antioxidantes podem proteger as células tumorais e permitir que o tumor torne-se mais agressivo. Esta agressividade pode levar à duplicação das células tumorais (Valadez-Vega et al., 2013).

Numa investigação feita por cientistas suecos na Universidade de Gothenburg, relacionou-se a toma de antioxidantes com a progressão do cancro do pulmão em

ratinhos geneticamente modificados que possuem os oncogenes K-RAS e B-RAF. Os radicais livres também atacam células tumorais, e danificam-nas. No caso do cancro do pulmão, para se protegerem dos ROS, as células tumorais do pulmão multiplicam-se e dividem-se mais rapidamente (Sayin et al., 2014).

Nesta investigação foram administrados dois antioxidantes: a N-acetilcisteína (NAC) e a vitamina E. Estes antioxidantes aumentam a proliferação do tumor a expressão da p53, responsável pela destruição de células tumorais; e diminuir o *stress* oxidativo. Os resultados obtidos revelaram que os antioxidantes triplicaram o número de células cancerígenas e aumentaram a sua severidade, e consequentemente os ratos morreram duas vezes mais rápido (**Figura 25**). Quanto maiores forem as doses de antioxidantes, maiores serão estes efeitos (Sayin et al., 2014).

Com estas evidências, conclui-se que grupos de risco de desenvolver cancro do pulmão como é o caso dos fumadores e de pessoas com doença obstrutiva pulmonar crónica (DPOC) que tomam acetilcisteína para diminuir a produção de muco nas vias respiratórias; devem evitar tomar suplementos antioxidantes (Sayin et al., 2014).

Numa investigação mais recente, os investigadores da Academia de Sahlgrenska em Gotenborg relacionaram os antioxidantes com o melanoma maligno na pele (Gal et al., 2015).

Nas células de ratinhos estudados foi observada a rapidez com que o melanoma atingiu os gânglios linfáticos; já nas células humanas observaram a rápida multiplicação de células cancerígenas na pele incluindo metástases.

Mais uma vez foi evidenciada a precaução na toma de suplementos antioxidantes por grupos considerados de risco, no entanto uma dieta com alimentos ricos em antioxidantes não deve ser considerada um fator de risco (Gal et al., 2015).

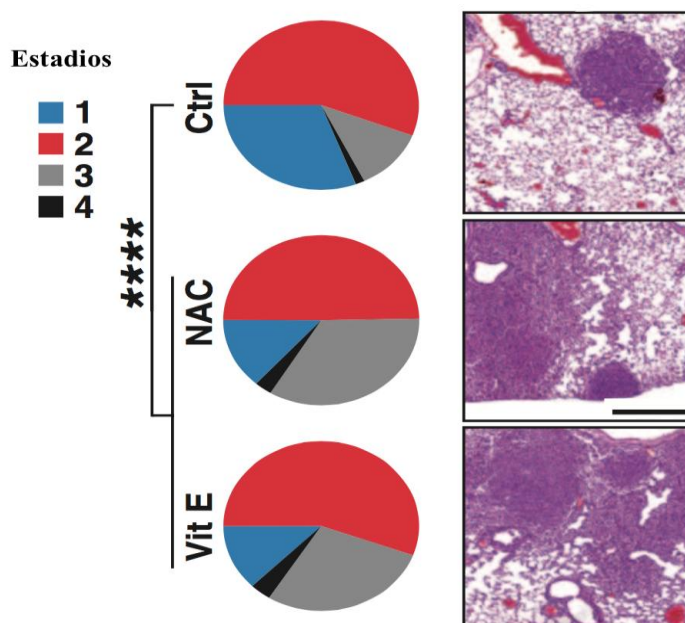


Figura 25– Avaliação da incidência de cancro do pulmão em vários estádios (I ao IV) em ratinhos K-RAS tratados com os antioxidantes Vitamina E e N-acetilcisteína. (Adaptado de Sayin et al., 2014).

Diversos estudos têm posto em causa os efeitos benéficos dos antioxidantes face ao cancro. Pode-se ver resumido na tabela seguinte alguns deles (**Tabela 1**).

Tabela 1- Estudos que demonstram a ação de certos antioxidantes na prevenção do cancro.

Estudos	Antioxidantes abordados nos estudos	Doença	Resultados
Estudo 1 (Arain & Abdul Qadeer, 2010)	Vitamina E	Cancro colorectal	Efeito pouco significativo na prevenção do cancro colorectal
Estudo 2 (Myung, 2010)	Vitaminas E,C,A, betacaroteno, e selénio	Cancro	Não ocorreu efeito significativo na prevenção de cancro. Aumento do risco de cancro da bexiga.

Estudo 3 (Bardia, 2008)	Betacaroteno, vitamina E e selénio	Cancro do pulmão	Aumento significativo na incidência de cancro nos fumadores pelo betacaroteno
Estudo 4 (Alkhenizan & Hafez, 2007)	Vitamina E	Cancro da próstata	Redução significativa da incidência do cancro da próstata

A toma excessiva de suplementos contendo antioxidantes pode provocar outros efeitos que não a proteção antioxidante do organismo. No entanto, uma dieta rica em alimentos com antioxidantes é muito mais benéfico devido à variedade de vários antioxidantes do que a toma de um suplemento apenas com um único antioxidante (Ferreira & Abreu, 2007).

No caso do consumo excessivo de beta caroteno ou carotenóides, em fumadores, há um aumento significativo do risco de incidência de cancro do pulmão (Kulbacka et al., 2012).

Nos estudos ATBC (α -Tocopherol, β -Carotene Cancer Prevention Study) elaborado na Finlândia e o CARET (Carotene and Retinol Efficacy Trial) nos Estados Unidos, os resultados revelaram que a toma de altas doses de suplementos de beta caroteno aumentam o risco de cancro do pulmão em fumadores (Druesne-Pecollo et al., 2010).

Já outro estudo feito pelo Instituto Americano do cancro (American Institute for Cancer Research) através de ensaios clínicos aleatorizados revelou que o risco elevado de cancro do pulmão em fumadores deve-se ao facto de o fumo dos cigarros criar condições favoráveis a um alto *stress* oxidativo onde o beta caroteno exerce o seu papel de pró-oxidante (Gallicchio et al., 2008).

O consumo excessivo de suplementos de selénio pode ser carcinogénico nos homens. O consumo de selénio foi relacionado com risco de desenvolver cancro da próstata. Num estudo feito na Universidade da Califórnia por investigadores do Instituto do Cancro Dana-Farber comprovou-se a relação existente entre elevadas doses de selénio no sangue e o cancro da próstata. Foi testado um grupo de homens com diferentes variantes genéticas do gene responsável pela superóxido dismutase 2 (SOD2) (Chan et al., 2009).

Numa das variantes, homens que possuíam doses tóxicas de selénio no sangue apresentaram um risco duas vezes superior de progressão do cancro da próstata do que homens com níveis mais baixos de selénio no sangue.

Em contrapartida, 25 % dos homens com uma variante diferente do gene responsável pela SOD2 e que possuíam níveis altos de selénio no sangue apresentaram um decréscimo do risco de desenvolver cancro da próstata mais agressivo em 40 % (Chan et al., 2009).

III. Conclusão

De uma forma geral, os defeitos genéticos da CRM levam a uma disfunção energética mitocondrial, que pode ter como consequências a diminuição das reservas de ATP celular e o aumento da produção de radicais livres de oxigénio. Esta produção de radicais livres leva a um desequilíbrio entre estes e as defesas antioxidantes denominando-se de *stress* oxidativo mitocondrial.

Por sua vez, a disfunção energética pode ser mais acentuada e pode também levar ao aumento da ocorrência de mutações no mtDNA, resultando em lesões irreversíveis e culminando na morte celular.

A exposição do organismo às espécies reativas do oxigénio levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa afim de inibir ou reduzir as lesões causadas pela ação destas espécies.

Este trabalho teve como objectivo principal destacar os principais mecanismos de produção de ROS, bem como a ação do sistema de defesa antioxidante; com o intuito de sublinhar as consequências adjuvantes do *stress* oxidativo mitocondrial. Este processo oxidativo tem sido associado com algumas patologias incluindo o cancro, o qual esteve em destaque.

A relação entre os ROS e o cancro pode ter duas vertentes: uma que relaciona a ação dos ROS com a instabilidade no genoma mitocondrial, devido a lesões no DNA, e com as alterações ao nível da proliferação celular, da divisão celular descontrolada, da resistência à apoptose e da angiogénese que contribuem para a carcinogénese; enquanto que a outra vertente associa os ROS como possíveis agentes na morte de células cancerígenas através de níveis citotóxicos de ROS e na inibição do sistema antioxidante das células tumorais.

Nesta perspetiva, a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes assumiu grande importância na proteção do organismo contra as lesões oxidativas ou mesmo a toma de suplementos de minerais e vitaminas antioxidantes.

Contudo, alguns estudos publicados recentemente colocaram em causa a utilização de antioxidantes na prevenção do cancro. Os resultados obtidos demonstraram que certos antioxidantes aumentam o risco potencial de desenvolver cancro. No entanto, os dados ainda não são conclusivos nas doses que seriam potencialmente nocivas.

IV. Bibliografia

- Abdulla, M., & Shukla, S. (2014). Dietary Aspects in Cancer Prevention — A Mini-Review. In F. Atroshi (Ed.), *Pharmacology and Nutritional Intervention in the Treatment of Disease* (pp. 179–187). InTech.
- Achkar, M. T., Novaes, G. M., José, M., & Silva, D. (2013). Importância Na Dieta E Na Conservação De Alimentos. *Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde*, 11(2), 398–406.
- Alkhenizan, A., & Hafez, K. (2007). The role of vitamin E in the prevention of cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Saudi Med.*, 27(6), 409–414.
- Arain, M. A., & Abdul Qadeer, A. (2010). Systematic review on “vitamin E and prevention of colorectal cancer.” *Pak J Pharm Sci.*, 23(2), 125–130.
- Bardia, A. (2008). Efficacy of antioxidant supplementation in reducing primary cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.*, 83(1), 23–34.
- Barreiros, A. L., David, J. M., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29(1), 113–123. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>
- Beattie, D. S. (2007). Bioenergética e metabolismo oxidativo. In *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas* (6^a ed., pp. 521–568). Editora Blucher.
- Belle, A., Piganeau, G., Gardner, M., & Eyre-Walker, A. (2005). An investigation of the variation in the transition bias among various animal mitochondrial DNA. *Gene*, 355, 58–66.
- Cadenas, E., & Sies, H. (1998). The lag phase. *Free Radic Res*, 28, 601–609.
- Chan, J. M., Oh, W. K., Xie, W., Regan, M., Stamfer, M. J., & King, I. B. (2009). Plasma Selenium, Manganese Superoxide Dismutase, and Intermediate- or High-Risk Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(22), 3577–3583. <http://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.8938>
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., & Parsons, M. J. (2011). The BCL2 family reunion. *Author Manuscript*, 37(3), 299–310.

- <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.025>.
- Dakubo, G. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects*, 99–116. <http://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>
- Druesne-Pecollo, N., Latino-Martel, P., Norat, T., Barrandon, E., Bertrais, S., Galan, P., & Hercberg, S. (2010). Beta-carotene supplementation and cancer risk: A systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *International Journal of Cancer*, 127(1), 172–184. <http://doi.org/10.1002/ijc.25008>
- Duk-Hee Kang, M. D., & Sung-Kyu Ha, M. D. (2014). Uric Acid Puzzle : Dual Role as Anti-oxidantand. *Electrolyte Blood Press*, 12, 1–6.
- Falkenberg, M. ., Larsson, N. ., & Gustafsson, C. (2007). DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annu. Ver. Biochem.*, 76, 679–699.
- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879.
- Ferreira, I., & Abreu, R. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Sociedade Portuguesa de Bioanalistas Da Saúde*, 32–39.
- Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci*, 893, 13–18.
- Gal, K. G., Ibrahim, M. X., Wirl, C., Sayin, V. I., Akula, M. K., & Karlsson, C. (2015). Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science Translational Medicine*, 7(308). <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad3740>
- Gallicchio, L., Boyd, K., Matanoski, G., Tao, X. G., Chen, L., Lam, T. K., ... Alberg, A. J. (2008). Carotenoids and the risk of developing lung cancer : a systematic. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(2), 372–383.
- Gillies, L. A., & Kuwana, T. (2014). Apoptosis Regulation at the Mitochondrial Outer Membrane. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(4), 632–640. <http://doi.org/10.1002/jcb.24709>
- Goraca, A., Huk-kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., & Skibska, B. (2011). Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*, 63, 849–858.

- Gospodaryov, D., & Lushchak, V. (2012). Oxidative Stress : Cause and Consequence of Diseases. In *Oxidative Stress and Diseases* (pp. 13–28). InTech. <http://doi.org/10.5772/38093>
- Grotto, D., Valentini, J., Boeira, S., Paniz, C., Maria, L. S., Vicentini, J., ... Garcia, C. (2008). Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo-malondialdeído. *Quim. Nova*, 31(2), 275–279.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186, 1–85.
- Hanson, R. W. (1989). The role of ATP in metabolism. *Biochem. Educ.*, 17(86).
- Iwabuchi, T., Yoshimoto, C., Shigetomi, H., & Kobayashi, H. (2015). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Endometriosis and Its Malignant Transformation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–7. <http://doi.org/10.1155/2015/848595>
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., & Hocevar, B. A. (2010). Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38(1), 96–109. <http://doi.org/10.1177/0192623309356453>
- Krishnamurthy, P., & Wadhvani, A. (2012). Antioxidant Enzymes and Human Health. In *Antioxidant Enzyme* (pp. 3–18). InTech. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/48109>
- Kruse, B., Narasimhan, N., & Attardi, G. (1989). Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*, 58(2), 391–397.
- Kulbacka, J., Saczko, J., Chwilkowska, A., Choromańska, A., & Skońska, N. (2012). Apoptosis , Free Radicals and Antioxidant Defense in Antitumor Therapy. In *Antioxidant Enzyme* (pp. 265 – 302). InTech. <http://doi.org/10.5772/2895>
- Lahance, P. A., Nakat, Z., & Jeong, W. S. (2001). Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition*, 17, 8358.
- Larson, R. A. (1997). Naturally occurring Antioxidants. *Journal of Food Lipids*, 4(4), 319.
- Li, M. X., & Dewson, G. (2015). Mitochondria and apoptosis: emerging concepts.

- F1000prime Reports*, 7(April), 42. <http://doi.org/10.12703/P7-42>
- Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer*, 112(6), 957–962. <http://doi.org/10.1038/bjc.2015.85>
- Marquez, R. T., Tsao, B. W., Faust, N. F., & Xu, L. (2013). Drug Resistance and Molecular Cancer Therapy: Apoptosis Versus Autophagy. In *Apoptosis* (pp. 155–177). <http://doi.org/105772/55415>
- Martin, S. A. (2011). Mitochondrial DNA Repair. In F. Storici (Ed.), *DNA repair- On the pathways to fixing DNA damage and errors* (pp. 313–326). InTech.
- Miguel, M., & Cordero, M. D. (2012). Oxidative Therapy Against Cancer. In *Oxidative Stress and Diseases* (pp. 497–514). InTech. <http://doi.org/10.5772/33251>
- Myung, S. K. (2010). Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann. Oncol.*, 21(1), 166–179.
- Nelson, D., & Cox, M. (2005a). Biosignaling. In *Lehinger, Principles of Biochemistry* (4th ed., pp. 421–474). W. H. Freeman.
- Nelson, D., & Cox, M. (2005b). Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In *Lehinger, Principles of Biochemistry* (4th ed., pp. 690–722). W. H. Freeman.
- Nelson, D., & Cox, M. (2013a). Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In *Lehinger, Principles of Biochemistry* (6th ed., pp. 731–766). W. H. Freeman.
- Nelson, D., & Cox, M. (2013b). Protein metabolism. In *Lehinger, Principles of Biochemistry* (pp. 1117–1122). W. H. Freeman.
- Nelson, D., & Cox, M. (2013c). The citric acid cycle. In *Lehinger, Principles of Biochemistry* (6th ed., pp. 633–649). W. H. Freeman.
- Novaes, G. M., Silva, M. J. D., Achkar, M. T., & Vilegas, W. (2013). Compostos Antioxidantes E Sua Importância Nos. *Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde*, 11(2), 535–539. <http://doi.org/10.5892/ruvrd.v11i2.535539>
- Novakovi, B., Jovi, J., & Gruji, M. (2015). Lifestyle Changes May Prevent Cancer. In *Cancer prevention- from mechanisms to translational benefits* (pp. 151–166). InTech.

- Ojala, D., Montoya, J., & Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, *290*, 470–474.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, *333*, 19–39.
- Pérez-Matute, P., Crujeiras, A. B., Fernández-Galilea, M., & Prieto-Hontoria, P. (2012). Compounds with Antioxidant Capacity as Potential Tools Against Several Oxidative Stress Related Disorders: Fact or Artifact? In *Oxidative Stress and Diseases* (pp. 543–566). InTech.
- Pflaum, J., Schlosser, S., & Muller, M. (2014). p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Frontiers in Oncology*, *4*(October), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fonc.2014.00285>
- Quintas, A. (2008). Cadeia transportadora de electrões e fosforilação oxidativa. In *Bioquímica Organização Molecular da Vida* (pp. 387–408). LIDEL.
- Quintas, A., & Ascenso, C. (2008). Ciclo do ácido cítrico. In *Bioquímica Organização Molecular da Vida* (pp. 371–385). LIDEL.
- Romero, A. C., Hernández, E. G. O., Cerón, T. F., & Chavez, A. A. (2013). The Exogenous Antioxidants. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Disease - A Role for Antioxidants* (pp. 33–56). InTech. <http://doi.org/10.5772/52490>
- Saikumar, P., & Venkatachalam, M. A. (2013). Apoptosis and cell death. In J. Rudner (Ed.), *Apoptosis* (pp. 29–40). InTech.
- Sayin, V. I., Ibrahim, M. X., Larsson, E., Nilsson, J., Lindahl, P., & Bergo, M. O. (2014). Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Science Translational Medicine*, *6*(221), 1–6. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007653>
- Schapira, A. H. V. (2006). Mitochondrial Disease. *Lancet*, *368*(9529), 70–82.
- Scheffler, I. E. (2007). Biogenesis of Mitochondria. In *Mitochondria* (2nd ed.). 978-0-470-04073-7.
- Schultz, R. M. (2007). Ciclo celular, morte celular programada e câncer. In *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas* (pp. 987–1000). Editora Blucher.
- Shokolenko, I., & LeDoux, S. (2011). Mitochondrial DNA damage, repair, degradation and experimental approaches to studying these phenomena. In *DNA repair - On the*

- pathways to fixing DNA damage and errors* (pp. 339–350). InTech.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol*, 82(2), 291–295.
- Silva, C. T., & Jasiulionis, M. G. (2014). Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. *Cienc. Cult.*, 66(1), 38–42.
- Silva, W., & Ferrari, C. K. B. (2011). Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria E Gerontologia*, 14(3), 441–451.
- Singh, K. K., Kulawiec, M., Still, I., Desouki, M. M., Geradts, J., & Matsui, S. (2005). Inter-genomic cross talk between mitochondria and the nucleus plays an important role in tumorigenesis. *Gene*, 354, 140–146.
- Smith, C., Marks, A. D., & Lieberman, M. (2004). Oxygen toxicity and free radical injury. In *Mark's basic medical biochemistry: a clinical approach* (2nd ed.).
- Smith, D. R. (2015). The past, present and future of mitochondrial genomics: have we sequenced enough mtDNAs? *Briefings in Functional Genomics*, 1–8. <http://doi.org/10.1093/bfgp/elv027>
- Taanman, J.-W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1410(2), 103–123. [http://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](http://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3)
- Tamura, R., Vasconcellos, J., Sarkar, D., Libermann, T., & Zerbini, L. (2012). GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med.*, 12(5), 634–651.
- Tokarz, P., & Blasiak, J. (2014). Role of mitochondria in carcinogenesis. *Acta Biochimica Polonica*, 61(4), 671–678. [http://doi.org/10.1016/0959-8049\(93\)90598-A](http://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90598-A)
- Trinidad, E. M. M., Gutiérrez, S. L. de I., Orozco, A. M. T. L., & Orozco, M. L. (2013). Disease and Therapy: A Role for Oxidants. In *Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants* (pp. 357–374). InTech.
- Valadez-Vega, C., Delgado-Olivares, L., Gonzalez, J. A. M., Garcia, E. A., Ibarra, J. R. V., Moreno, E. R., ... Ramos, Z. C. (2013). The role of natural antioxidants in cancer disease. In *Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants* (pp. 391–418). InTech. <http://doi.org/10.5772/51503>

- Weber, J., & Senior, A. E. (2003). ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS Letters*, 545(1), 61–70. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00394-6](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00394-6)
- Weidinger, A., & Kozlov, A. V. (2015). Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*, 5(2), 472–84. <http://doi.org/10.3390/biom5020472>