



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INFLUÊNCIA DE ESPÉCIES OXIDATIVAS NA
CARCINOGENESE**

Trabalho submetido por:

Fábio Wilson Martins de Jesus

para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INFLUÊNCIA DE ESPÉCIES OXIDATIVAS NA
CARCINOGENESE**

Trabalho submetido por

Fábio Wilson Martins de Jesus

para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por:

Prof. Doutor Carlos Monteiro

outubro de 2019

Agradecimentos

À minha Mãe, o especial obrigado por tudo o que fez por mim ao longo destes anos, sempre me apoiou e motivou para continuar em frente e nunca desistir, sem ti nunca seria possível.

Ao meu pai quero agradecer todo o apoio que me deu e toda a paciência que teve comigo ao longo destes anos.

À Minha irmã, agradeço por me apoiar e por ser exigente comigo, e por toda a paciência que teve no decorrer destes anos e por me encorajar nesta época menos fácil da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Doutor Carlos Monteiro, quero agradecer toda a disponibilidade e ajuda que me proporcionou neste desafio final do meu trajeto enquanto academista.

Ao meu cunhado, um obrigado pelo apoio incondicional e por ser um exemplo de profissionalismo para mim.

Ao meu sobrinho um obrigado por me encorajar a fazer o simples, e por me dar forças para representar um exemplo a seguir.

Aos meus amigos João Alegrias e Diogo Castro, um obrigado por me acompanharem nos bons e nos maus momentos, e por me ajudarem nesta reta final da minha vida académica.

Aos meus amigos no algarve queria agradecer por todo o apoio que me deram, por terem sobretudo acreditado nas minhas capacidades, quando os resultados eram menos bons.

Aos meus colegas de curso, queria agradecer por todos os momentos felizes que me proporcionaram que nunca me esquecerei e por isso levo-vos comigo seja para onde for.

Resumo

A carcinogénese é um processo complexo e generalizado de formação de patologia neoplásica, que pode ser influenciado e desencadeado por meio de ataques indiscriminados por parte de espécies reativas derivadas do oxigénio. Estas espécies têm um papel fundamental em cascatas vias de sinalização e fatores de transcrição fundamentais para o bom desempenho celular. Esta sinalização bem como os fatores de transcrição são essenciais para fenómenos como proliferação, crescimento e divisão celular, tal como eventos tumorais evasivos como a angiogénese e a metastização.

Esta revisão monográfica tem como objetivo, o esclarecimento do processo complexo de formação de cancro. Focando-se no papel das várias espécies reativas do oxigénio entre outras e dos seus ataques sem discriminação ao conteúdo intracelular e extracelular.

Para produção desta monografia, foi efetuada pesquisa bibliográfica de diversos artigos científicos e alguns livros, compreendidos, na sua generalidade entre os anos 1999 e 2019. Deste modo, para a pesquisa feita foram utilizadas algumas bases de dados como *ScienceDirect*, *Google Scholar* e *PubMed*, mediante a utilização de palavras-chave.

Palavras-chave: Antioxidantes; Carcinogénese; Espécies reativas do oxigénio; Stress Oxidativo

Abstract

Carcinogenesis is a complex and widespread process of neoplastic pathology formation which can be influenced and unleashed by indiscriminate attacks by reactive oxygen species. These particular species have a remarkable role in cell signaling and transcription factors that are fundamental for the optimal cell performance. This signaling as well as the transcription factors are necessary for phenomenon such as proliferation, growing and mitosis like tumour evasive events such as angiogenesis and metastasis.

This monography has the purpose to clarify the complex process of tumefaction by focusing on the role of diverse reactive oxygen species and their indiscriminate attacks to the intra and extracellular content.

To produce this monography, the bibliographic research included scientific articles and books, edited between 1999 and 2019. The used search engines were ScienceDirect, Google Scholar and Pubmed through the combined use of selected keywords.

Keywords: *Antioxidant; Carcinogenesis; Reactive Oxygen Species; Oxidative Stress*

Índice de Figuras

Figura 1 - Etapas da carcinogénese (adaptado de klaunig & Wang, 2018)	17
Figura 2 - Ciclo celular e proteínas reguladoras do seu progresso; Moléculas a roxo são indutoras do progresso do ciclo celular; Moléculas a azul são inibidoras do ciclo celular (adaptado de Otto & sicinski, 2017)	23
Figura 3 - Representação das fontes e conversão de ROS (adaptado de Galadari et al., 2017)	26
Figura 4 - Fontes intracelulares de ROS e RNS (adaptado de Gào & Schöttker, 2017)	28
Figura 5 - Estrutura anatómica da mitocôndria (adaptado de Lodish et al., 2014).....	29
Figura 6 - Resumo da oxidação aeróbia de ácidos gordos e da glicólise (Lodish et al., 2014)	30
Figura 7 - Resumo do caminho efetuado pelos prótons e eletrões no complexo I (adaptado de Lodish et al., 2014).....	31
Figura 8 - Resumo do caminho efetuado pelos prótons e eletrões no complexo II ((adaptado de Lodish et al., 2014)	32
Figura 9 - Resumo do ciclo Q do complexo III mitocondrial (adaptado de Lodish et al., 2014)	32
Figura 10 - Fluxo de prótons e eletrões no complexo IV mitocôndria (adaptado de Lodish et al., 2014).....	34
Figura 11 - Representação da comunicação redox do reticulo endoplasmático (adaptado de Zeeshan et al., 2016).....	36
Figura 12 - Representação da produção e regulação de espécies reativas do oxigénio (adaptado de Moloney & Cotter, 2018)	42
Figura 13 - Representação da primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (adaptado de Ighodaro & Akinloye, 2018).....	44
Figura 14 - Modelo do equilíbrio entre pro-oxidantes e antioxidantes (adaptado de Reuter et al., 2010).....	51
Figura 15- Representação da sensibilidade de células normais vs células neoplásicas (adaptado de Reuter et al., 2010).....	52
Figura 16 - Fluxograma da influencia de ROS na célula (adaptado de Moloney & Cotter, 2018)	53

Figura 17 - Representação da influência de ROS na regulação de proteínas quinases mitogeno-ativadas (MAPK) (adaptado de Jalmi & Sinha, 2015).....	57
Figura 18 - Consequências oncológicas da ativação Consequente de Nrf2 (adaptado de Leinonen et al., 2014).	65
Figura 19 - Diagrama explicativo da influência da p53 na sobrevivência e proliferação celular (Labuschagne et al., 2018).....	71

Índice de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de Espécies reativas do oxigénio - Radicais livres e não radical (adapatado de Hrycay & Bandiera, 2015).....	25
Tabela 2. Exemplos de PTP's supressores de tumor (adaptado de Bollu et al., 2017)..	59
Tabela 3. Exemplos PTP's oncogénicas e a referente patologia oncologica (adaptado de Bollu et al., 2017)	60
Tabela 4. Exemplos moléculas anticancerígenas direcionadas à via de sinalização RTQ (adapado de Regad, 2015).....	62

Índice de Abreviaturas

AP-1 - A Proteína Ativadora 1 do inglês “Activator protein 1”

ATP- Adenosina Trifosfato do inglês “Adenosine Triphosphate”

BMK1 - Grande proteína quinase 1 ativada por mitogéno do inglês “Big mitogen-activated protein kinase 1”

CDK - Quinase Dependente De “Ciclina do inglês Cyclin-dependent kinase”

CoA - Coenzima A do inglês “Coenzyme A”

CoQ - Coenzima Q do inglês “Coenzyme Q”

COX – Cicloxigenases do inglês “Cyclooxygenase”

DAG – Diacilglicerol do inglês “Diacylglycerol”

eNOS - Oxido Nitrico Sintases Endoteliais do inglês “Endothelial Nitric Oxide Synthases”

FAD - Dinucleótido De Flavina E Adenina do inglês “Flavin-Adenine dinucleotide”

FMN - Flavina Mononucleotido do inglês “Flavin mononucleotide”

FOXO - "Forkhead Box O"

GPX - Glutathiona Peroxidase do inglês “glutathione peroxidase”

GR - Glutathiona Redutase “glutathione reductase”

GSH – Glutathiona do inglês “glutathione”

HIF - Fator De Indução De Hipóxia do inglês “Hipoxya-inducible fator”

iNOS - Oxido Nitrico Sintases Indutíveis do inglês “Inducible Nitric Oxide Syntases”

JNK - “C-Jun N-Terminal Kinases”

LOX – Lipoxigenase do inglês “Lipoxygenase”

MAPK - Proteina Quinase Mitogeno Ativada do inglês “mitogen-activated protein kinase”

NOX - NADPH Oxidase do inglês “NADPH Oxidase”

nNOS - Oxido Nítrico Sintases Neurais do inglês “neural Nitric Oxide Synthases”

NOS - Oxido Nítrico Sintase do inglês “Nitric Oxide Synthase”

NRTK - Citoquinas Não Recetores Tirosina Quinase do inglês “Non-Receptor Cytokines Tyrosine Kinase”

P38 - Proteína Quinase Mitogénica Ativada P38 do inglês “ P38 mitogen-activated protein kinase”

PI3K - Fosfonositido-3-Quinase do inglês “Phosphoinositide 3-kinase”

PKB - Proteína Quinase B do inglês “Protein Kinase B”

PKC - Proteína Quinase C do inglês “Protein Kinase C”

PTP - Proteína Tirosina Fosfatase do inglês “Protein Tyrosine Phosphatase”

PTK - Proteína Tirosina Quinase do inglês “Protein Tyrosine Kinase”

PRX – Peroxirredoxina do inglês “peroxiredoxin”

ROS - Espécies Reativas Do Oxigénio do inglês “Reactive oxygen species”

RNS - Espécies Reativas Do Nitrogénio do inglês “Reactive nitrogen species”

RTK - Citoquinas Recetoras De Tirosina Quinase do inglês “Receptor Tyrosine Kinases “

SOD - Superóxido Dismutase do inglês “Superoxide Dismutase”

SOR - Superóxido Redutase do inglês “Superoxide Reductase”

TNF - Fator De Necrose Tumoral do inglês “Tumor Necrosis Factor”

TRX – Tiorredoxina do inglês “Thioredoxin”

VEGFR - Recetor De Fator De Crescimento Endotelial Vascular do inglês “Vascular Endothelial Growth Factor Receptor”

XO - Xantina Oxidase do inglês “xanthine oxidase”

Índice Geral

I. INTRODUÇÃO	13
II. DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1. CARCINOGENÉSE	17
2.1.2. CICLO CELULAR	19
2.1.2.1. FASE G ₁	20
2.1.2.2. FASE S.....	20
2.1.2.3. FASE G ₂	20
2.1.2.4. FASE M	21
2.1.2.5. FASE G ₀	21
2.1.2.6. REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	21
2.2. ESPÉCIES REATIVAS DERIVADAS DO OXIGÊNIO	23
2.3. FONTES DE ROS	27
2.3.1. ORGANELOS PRODUTORES DE ROS E RNS	28
2.3.1.1. MITOCÔNDRIA E CADEIA RESPIRATÓRIA.....	28
2.3.1.1.1. COMPLEXO I	30
2.3.1.1.2. COMPLEXO II	31
2.3.1.1.3. COMPLEXO III.....	32
2.3.1.1.4. COMPLEXO IV	33
2.3.1.2. RETICULO ENDOPLASMÁTICO	35
2.3.1.3. PEROXISSOMA	36
2.3.2. ENZIMAS PRODUTORAS DE ROS E RNS.....	37
2.3.2.1. NADPH-OXIDASE (NOX).....	37
2.3.2.2. CICLOXIGENASES (COX).....	38
2.3.2.3. LIPOXIGENASE (LOX).....	38
2.3.2.5. ÓXIDO NÍTRICO SÍNTASES (NOS)	39

2.3.2.6. CITOCROMO P450	40
2.4. ANTIOXIDANTES	41
2.4.1 PRIMEIRA LINHA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	43
2.4.2 SEGUNDA LINHA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	45
2.5. <i>STRESS</i> OXIDATIVO	50
2.6. O PAPEL DO MICROAMBIENTE CELULAR NO CANCRO	52
2.6.1. A IMPORTÂNCIA DE ROS NAS CASCATAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL QUINASE/FOSFATASE	53
2.6.1.1. A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT	54
2.6.1.2. A INFLUÊNCIA DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS QUINASES MITOGENO-ATIVADAS (MAPK)	56
2.6.1.3. O PAPEL DAS PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASE (PTP) E PROTEÍNAS TIROSINA QUINASE (PTKS)	58
2.6.2. FATORES DE TRANSCRIÇÃO CRÍTICOS NA CARCINOGENESE	64
2.6.2.1. FATOR NUCLEAR ERITROIDE 2 RELACIONADO AO FATOR 2 (NRF2)	64
2.6.2.2. FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF-KB)	66
2.6.2.3. PROTEÍNA ATIVADORA-1 (AP-1)	67
2.6.2.4. PROTEÍNA STAT	67
2.6.2.5. HIF	68
2.6.2.6. “FORKHEAD BOX O” (FOXO)	69
2.6.2.7. PROTEÍNA P53	70
III. CONCLUSÃO	73
IV. BIBLIOGRAFIA	75

I. Introdução

As espécies reativas derivadas do oxigénio são partículas com vários papéis distintos no nosso sistema biológico. A sua natureza pode advir de fatores exógenos, ou como produtos de metabolização intrínsecos. O seu desempenho concreto *in vivo* ainda está longe de se compreender a um nível detalhado (Reczek & Chandel, 2017).

Hoje em dia, compreende-se que a reatividade destas partículas são indispensáveis ao bom funcionamento celular, através da sua ação sobre as vias de sinalização. No entanto, o seu papel pode ser ambíguo devido à sua envolvência no processo de formação de neoplasias. Desta forma as espécies reativas derivadas do oxigénio têm sido associadas a várias doenças neurodegenerativas, metabólicas e oncológicas (Reczek & Chandel, 2017).

A exposição de tecidos, células e matriz extracelular a fontes exógenas, tais como radiações, químicos, fármacos, tabagismo e outros xenobióticos levam através do metabolismo intracelular à produção de compostos resultantes da ativação ou redução do oxigénio molecular, as espécies reativas do oxigénio (ROS), que juntamente com as espécies reativas de azoto (RNS), constituem uma grande variedade de moléculas que se dividem por radicais e não radicais. (Gào & Schöttker, 2017)

Estes radicais livres são indispensáveis a correta atividade celular, especialmente em eventos de transmissão de sinal, no entanto, o seu carácter reativo, torna estas espécies perigosas, provocando lesões nas estruturas celulares. (Reczek & Chandel, 2017)

Para contrabalançar os efeitos nocivos de ROS, o organismo é aprimorado com uma diversidade de antioxidantes, que se dividem em duas categorias, as enzimáticas e as não enzimáticas, de origem endógena e exógena. Estas moléculas formam uma linha de defesa capaz de inibir os danos oxidativos provenientes quer de ROS como de RNS, através da inibição da formação de radicais livres, eliminação, neutralização e reparação a danos celulares levando a uma diminuição do *stress* oxidativo. Fenómeno que se caracteriza pelo desequilíbrio entre a sobreprodução de espécies reativas e a saturação de partículas antioxidantes. Este evento concebe um microambiente reativo, predisposto aos ataques nocivos de ROS que conseqüentemente poderá comprometer o bom funcionamento celular de estruturas fundamentais (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum,

& Kalayci, 2012; Mirończuk-Chodakowska, Witkowska, & Zujko, 2018; Moloney & Cotter, 2018).

A Oncologia é a ciência que estuda um conjunto patologias neoplásicas que presentemente continuam a afetar milhões de indivíduos, em todo o mundo. Sendo esta uma das áreas de maior interesse na Medicina. A American Cancer Society relata um decréscimo na taxa de mortalidade desde 1991. No entanto, novos casos de cancro em 2019 continuam a ser um problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento que contrariam a estatística que relata a diminuição de mortalidade relacionada com a doença (Siegel, Miller, & Jemal, 2019).

Em Portugal tal como no resto da Europa, observa-se um acréscimo na incidência da doença com uma taxa constante de 3% ao ano. Este fenómeno pode resultar de vários fatores, tais como, o envelhecimento populacional, o aumento na taxa de sucesso dos novos tratamentos de patologia aguda e crónica, e a alteração do comportamento do estilo de vida. A direção geral de saúde realça a importância de intervenção nas seguintes áreas: cessação tabágica, proteção solar, erros alimentares como a obesidade, consumo excessivo de álcool e infeção por alguns vírus (Oncológicas, 2017).

O progresso clínico da doença é diretamente dependente da precocidade e da qualidade do diagnóstico. Consequentemente, a taxa de mortalidade depende da espécie de tumor que poderá ser benigno ou maligno (Siegel et al., 2019).

A espécie benigna é caracterizada por ser estruturalmente regular, o seu crescimento é expansivo, progressivo, lento e localizado. Inclui uma baixa taxa de crescimento celular com morfologia bem diferenciada (semelhante às células do tecido original). Possui um diagnóstico benévolo com baixa taxa de recidiva pós recissão. Por outro lado os tumores de carácter maligno caracterizam-se por fronteiras imprevisíveis com fisionomias irregulares e indiferenciadas, definem-se por uma rápida proliferação, expansiva e invasiva por estruturas anatómicas adjacentes com produção de metástases por outros órgãos. Apresenta um elevado índice mitótico com possibilidade de recidiva pós tratamento Sendo estes últimos designados por cancro, termo globalmente utilizado para descrever um grande número de doenças (K. Purves, Sadava, H.Orions, & Heller, 2002; Pain & Adults, 2018).

Em meados dos anos 70, através de estudos cinéticos que visaram observar a proliferação celular, descobriu-se transversalmente um “fator de perda celular” associado

a regressão do cancro. Inicialmente associou-se a necrose, (fenómeno catastrófico e morte celular não programada) pela perda maciça de massa celular, estudos posteriores levantaram a hipótese destas regressões estarem envolvidas com apoptose, tendo em conta as coincidências sucessivas de regressão espontânea de tumores relacionado com o aumento deste tipo de morte celular (Lowe & Lin, 2000).

Lowe & Lin (2000) preconiza que as células que sofrem de mutações oncogénicas envolvidas na diminuição da apoptose e que posteriormente suportam episódios de seleção natural nas várias fases da carcinogénese, tem maior probabilidade de se tornarem malignas. Desta forma, conclui-se que a ausência da apoptose contribui para a progressão e proliferação de células neoplásicas, sendo um fator importante para a malignidade e que dificulta de forma direta o sucesso dos procedimentos terapêuticos com citotóxicos (Lowe & Lin, 2000).

Tem-se chegado à conclusão que a quantidade infinita de genes mutados que expressam células malignas e que partilham alterações nas mesmas vias metabólicas, representam uma grande dificuldade na investigação de novos tratamentos. Este fato inflaciona o esforço financeiro para o desenvolvimento de novas tecnologias para as áreas de diagnóstico e de terapêutica da doença (Wishart, 2015).

De acordo com Gào & Schöttker (2017) níveis excessivos de ROS e RNS podem reagir diretamente com ácidos nucleicos levando à instabilidade genómica tanto a nível do DNA nuclear como do DNA mitocondrial o que promove a carcinogénese. Para além do dano oxidativo, as espécies reativas estão envolvidas na interrupção da sinalização e regulação redox. Esta interferência nas vias de sinalização por parte do *stress* oxidativo pode promover alguns eventos importantes na biologia do cancro, como, a sobrevivência, o crescimento, a proliferação celular, metastização, a angiogénese, a inibição da morte celular programada, e por fim resistência à quimioterapia e radioterapia (Gào & Schöttker, 2017).

Contudo a acumulação de evidências indica que as espécies reativas podem agir como promotoras ou supressoras de cancro, esta dupla funcionalidade depende do contexto oxidativo que a célula se encontra (Gào & Schöttker, 2017).

Além disso a bibliografia relata que o *stress* oxidativo incorpora uma diversidade de fatores de risco para algumas patologias neoplásicas, reforçando a importância das vias

de sinalização redox como novas oportunidades para reconhecer novos alvos de tratamento e prevenção no cancro (Gào & Schöttker, 2017).

II. Desenvolvimento

2.1. Carcinogénese

A carcinogénese é um processo de várias fases que envolve mutações em genes críticos, seguido pela proliferação seletiva de células anómalas. Além disso, estas modificações genéticas induzem a promoção de crescimento celular, o aumento da taxa de divisão celular, e a diminuição na taxa de morte celular programada ou apoptose. (Klaunig & Wang, 2018)

A célula cancerígena é desta forma caracterizada por diversas particularidades estruturais, moleculares e comportamentais. A ação coletiva de um conjunto de alterações é essencial para o desenvolvimento maligno da célula. Desta forma, o foco fisiológico do cancro deve direcionar-se para a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento, potencial replicativo ilimitado, angiogénese sustentada, invasão tecidual e metástase (Klaunig & Wang, 2018).

No decorrer da proliferação descontrolada da célula mutada, acompanhado de um meio de instabilidade genómica, torna-se suscetível o aparecimento de novas alterações genéticas e epigenéticas (Klaunig & Wang, 2018).

De forma a caracterizar estas mudanças, dividiu-se o processo neoplásico em três principais fases: iniciação, promoção e progressão (figura 1) (Klaunig & Wang, 2018).

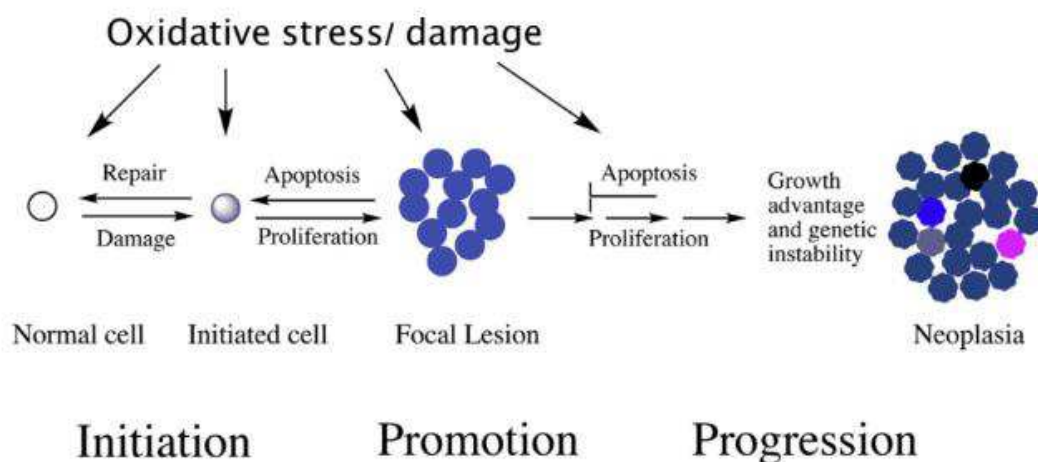


Figura 1 - Etapas da carcinogénese (adaptado de klaunig & Wang, 2018)

A fase de iniciação é causada por incidentes genotóxicos. Estes incidentes são produzidos por agentes carcinogénicos físicos, como as radiações e luz UV e/ou agentes carcinogénicos químicos com propriedades mutagénicas que provocam danos no ácido desoxirribonucleico, DNA, havendo formação de alterações numa célula. A esta célula mutada pode se dar o nome de célula preneoplásica, que contém alterações no genoma. Nesta fase é impossível detetar clinicamente um tumor. Para além, da exposição celular ao material genotóxico, estudos relatam a existência de mutações adquiridas por erros nos mecanismos de reparação de DNA, durante o processo de proliferação celular. (Klaunig & Wang, 2018)

Apesar desta etapa ser de carácter irreversível, o processo de iniciação é dependente do contacto contínuo com o agente genotóxico. Contudo, em ambiente *in vivo*, nunca foi nitidamente identificado um relacionamento direto entre a supressão da exposição do agente genotóxico com a diminuição do risco de cancro, exceto radiações. Este tema continua controverso pela dificuldade de associar a frequência de exposição de fatores de risco com o surgimento tardio da neoplasia (Klaunig & Wang, 2018).

A fase de promoção é caracterizada por haver clonagem seletiva da célula mutada (pré neoplásica), observando-se um aumento na taxa de divisão e crescimento celular e/ou uma diminuição da morte celular programada (apoptose)la. Este crescimento clonal seletivo pode ser explicado através da exposição de agentes químicos ou fatores fisiológicos endógenos, que envolve modulação da expressão genética que consequentemente influencia a divisão celular e apoptose. Resumidamente, a etapa de promoção tumoral altera a expansão da célula pré neoplásica para uma lesão localizada (Klaunig & Wang, 2018).

Apesar da reversibilidade que qualifica esta etapa do processo neoplásico, os eventos da fase de promoção também são dependentes do contato contínuo dos agentes neoplásicos, igualando o ocorrido na fase de iniciação (Klaunig & Wang, 2018).

Após a fase de promoção, ocorre transformações celulares e moleculares na célula pré neoplásica transitando assim para o estado neoplásico. A etapa da progressão é geneticamente instável, irreversível e envolve rutura da integridade cromossómica. Ao contrário do que acontece no estágio de promoção do tumor, a progressão é caracterizada por ser irreversível e independente da exposição contínua aos estímulos presentes na fase

de iniciação e promoção. É nesta fase que surge as primeiras manifestações clínicas (Klaunig & Wang, 2018).

A classificação do processo de carcinogénese em múltiplas fases simplifica de algum modo, a compreensão deste processo bastante complexo, facilitando o enquadramento da atuação dos vários fatores determinantes de cancro. Estes podem interagir em todas as etapas do processo, ou apenas, em fases seletivas. Por exemplo, as partículas promotoras de tumor apenas atuam na fase de promoção tumoral (Klaunig & Wang, 2018).

2.1.2. Ciclo celular

Para que haja um bom funcionamento de organismos multicelulares nomeadamente mamíferos, é essencial a existência de uma correta vigilância e controlo do ciclo celular. Toda a arquitetura celular de cada tecido deve conferir de modo preciso para haver uma reprodução fiel ao programa de desenvolvimento completo de cada indivíduo (Otto & Sicinski, 2017).

As células cancerígenas são caracterizadas pela sua proliferação descontrolada, que é, conseqüente da atividade aberrante, de proteínas que integram e regulam os vários processos do ciclo celular (Otto & Sicinski, 2017).

Para compreender o processo da carcinogénese é necessário interiorizar os vários eventos que ocorrem durante o ciclo celular, bem como os seus pontos de controlo e regulação. Para a maioria das células o ciclo celular é dividido em duas etapas fundamentais a interfase, que por sua vez inclui três subfases identificadas como G1, S e G2, e a mitose (fase M). No entanto alguns tipos de células perdem a capacidade de dividir por mitose à medida que amadurecem e permanecem na interfase, numa quarta fase designada por G0 (Otto & Sicinski, 2017).

A progressão no ciclo celular através da passagem de uma fase para a outra é controlada através de fatores de regulação, de modo geral proteicos, que atuam nos chamados pontos de controlo. De entre essas proteínas as que se destacam são as ciclinas que controlam a passagem da fase G1 para a fase S, da fase G2 para a mitose e o último controlo durante a mitose mais propriamente na metáfase (K. Purves et al., 2002).

Estes pontos incluem a sinalização de fatores de crescimento e de proteínas que monitorizam a integridade física do DNA, verificando a ausência ou presença de danos genéticos, possivelmente causados por ROS. (Malumbres & Barbacid, 2009)

2.1.2.1. Fase G₁

O período entre o fim da mitose e o começo da fase S é designado por fase G₁ também conhecido por primeiro intervalo, é caracterizado pelo aumento de volume celular e biossíntese de enzimas e componentes celulares, Imediatamente após a conclusão deste evento, as células que apresentam dimensões adequadas e com a formação dos componentes moleculares necessários para as etapas posteriores cruzam um ponto em G₁ denominado por INÍCIO (START). Na origem deste momento a divisão celular torna-se irreversível (K. Purves et al., 2002).

2.1.2.2. Fase S

Na fase S, a célula sintetiza uma cópia completa do seu DNA, através da replicação ativa dos cromossomas. Nesta fase também ocorre a duplicação da estrutura responsável pela formação de microtúbulos, os centrossomas. Esses microtúbulos, também conhecidos como fuso acromático, ajuda na separação dos cromossomas através da sua movimentação durante o processo de mitose (K. Purves et al., 2002).

2.1.2.3. Fase G₂

Durante a segunda fase do, ou fase G₂ a célula apresenta um maior volume. Nesta fase é restabelecido os níveis de energia, ocorre a produção de proteínas necessárias à segregação de cromossomas. O citoesqueleto reorganiza-se dando origem a recursos, para a fase mitótica. As últimas preparações, devem ser finalizadas e verificadas para o começo normal da mitose (K. Purves et al., 2002).

2.1.2.4. Fase M

Na fase mitótica (M) o processo é contínuo e envolve dois processos distintos: a mitose e a citocinese. A mitose é composta por várias etapas; a prófase, a prometáfase, a metáfase, a anáfase, a telófase. Em suma este processo capacita a divisão celular, quebrando o involucro nuclear, encaminhando os cromossomas por biorientação para o plano equatorial do fuso acromático. De seguida, ocorre a separação do cromossoma e os cromátídeos migram para pólos opostos. Quando essa migração é finalizada as células iniciam a remontagem e a divisão do involucro nuclear, dando-se por finalizada a mitose. A divisão do citoplasma da célula é efetuada na citocinese por ação do anel contrátil levando à formação de um sulco de clivagem que separa as células-irmãs. Após este processo as duas novas células contêm todos os compostos de uma célula completa (K. Purves et al., 2002).

2.1.2.5. Fase G₀

Hipoteticamente podemos falar numa quinta fase da interfase, visto que nem todas células seguem o regime clássico do ciclo celular, no caso das células nervosas ou do músculo cardíaco, bem como, a maioria das células constituintes de vários tecidos onde subsiste o intervalo G₀, um estágio inativo que espera pela estimulação de fatores mitogénicos para retomar o progresso do ciclo celular (Otto & Sicinski, 2017).

Assim sendo, para manter coerência na arquitetura tecidual as células dum ser humano adulto dividem-se apenas quando necessário evitando o aparecimento de lesões proliferativas neoplásicas (Lodish et al., 2014).

2.1.2.6. Regulação do ciclo celular

A articulação e a concordância entre o crescimento e a divisão celular é essencial para uma replicação celular saudável, mantendo a replicação de DNA precisa e completa antes de iniciar a divisão celular. Em caso contrário a probabilidade de ocorrer alterações genéticas aumentam exponencialmente, e se estas resultarem na perda do controlo do

crescimento e divisão celular, a probabilidade do surgimento do processo neoplásico sobe radicalmente (Lodish et al., 2014) .

A descoberta de inúmeras proteínas envolvidas na detecção de danos genéticos, bem como, na sua reparação durante o processo do ciclo celular, revelou significância relativamente ao processo de formação de neoplasias (Otto & Sicinski, 2017).

Pesquisas demonstram a infinidade de danos possíveis ao DNA limitando a utilização de reparadores de danos genéticos por parte da célula, possibilitando a interrupção do ciclo celular ou a sua entrada no processo apoptótico, e consequentemente impedindo a propagação do erro genético (Malumbres & Barbacid, 2009).

Posto isto, as várias etapas do ciclo celular são conduzidas por proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDK), que atuam formando complexos com as suas ciclinas análogas. Fatores que promovem a carcinogênese como instabilidade genômica, instabilidade cromossômica e proliferação celular não programada são reguladas de forma direta e indireta pelas CDK's (Malumbres & Barbacid, 2009).

A progressão do ciclo celular é monitorizada por pontos de verificação (CHK) que deteta possíveis erros durante a síntese de DNA e segregação cromossômica. Quando estas vias de verificação detetam defeitos no ciclo celular relacionados com agentes genotóxicos, inibem as CDK's, promovendo a interrupção do ciclo celular. Os fatores mitogênicos são responsáveis pela ativação de redes de sinalização intracelulares por meio de mecanismos fosforilação. Estas embatem nas CDK possibilitando a célula recuperar o progresso do ciclo celular podendo transitar da fase G1 para a fase S e da Fase G2 para a fase M (figura 2) (Malumbres & Barbacid, 2009).

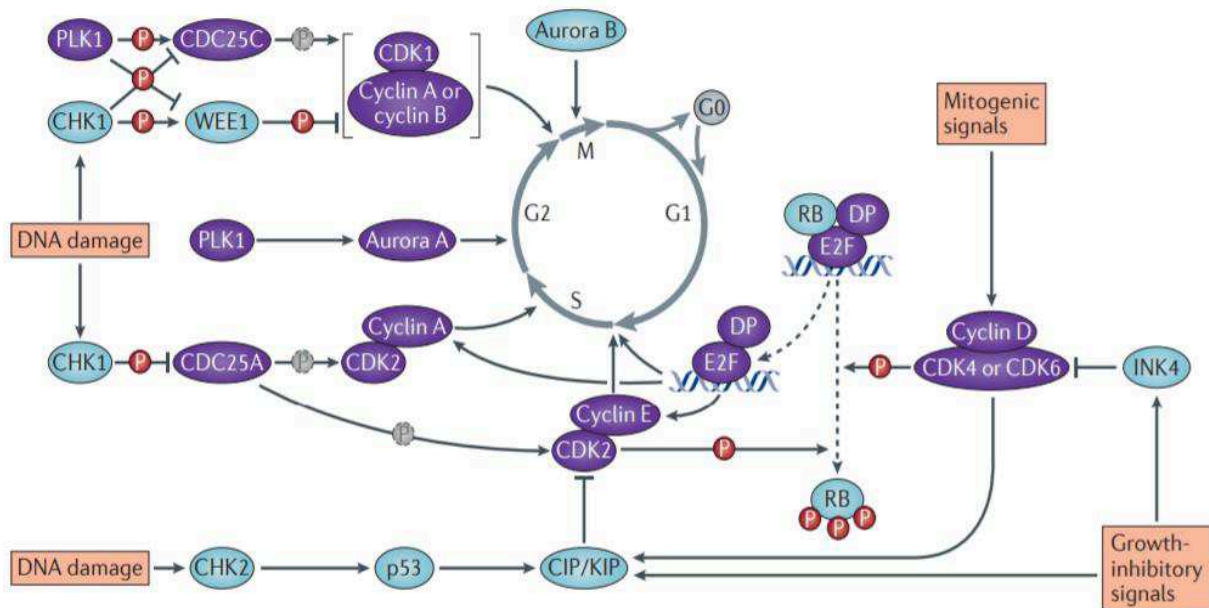


Figura 2 - Ciclo celular e proteínas reguladoras do seu progresso; Moléculas a roxo são indutoras do progresso do ciclo celular; Moléculas a azul são inibidoras do ciclo celular (adaptado de Otto & Sicinski, 2017)

A presença de CDK's anormalmente ativadas em vários tipos de cancro introduz um possível mecanismo de ação para o desenho de novas drogas anticancerígenas através da inibição das quinases dependentes de ciclinas que consequentemente interferem no progresso do ciclo celular (Otto & Sicinski, 2017b).

Para além disso, estudos em mamíferos demonstraram que a inibição de CDK não só pode levar à inibição do progresso do ciclo celular e consequentemente à inibição do progresso da neoplasia, como também, levar células cancerígenas à sua senescência ou até mesmo à apoptose. Este fenómeno demonstra “dependência” das células tumorais à presença de CDK, suscitando a possibilidade da sua inibição ser seletiva apenas para células cancerígenas, evitando tecidos saudáveis (Otto & Sicinski, 2017).

2.2. Espécies reativas derivadas do oxigénio

No sistema biológico o oxigénio (O_2) encontra-se em lípidos, proteínas, hidratos de carbono e aminoácidos, ácidos gordos, açúcares, hormonas e vitaminas. O caminho do O_2 segue-se pela sua redução em ($\bullet O_2^-$), por consequência de vários mecanismos da

mitocôndria, retículo endoplasmático e enzimas (Hrycay & Bandiera, 2015; Z. Li, Pearlman, & Hsieh, 2016).

Entende-se como radical livre uma molécula ou átomo que se encontra num estado de desemparelhamento eletrônico, apresentando-se altamente instáveis e com uma elevada reatividade devido ao desemparelhamento dos elétrons nas suas orbitais. Estas espécies reativas são regularmente produzidas como produtos metabólicos, é o caso dos derivados da degradação da cadeia de oxigénio denominados por espécies reativas derivadas do oxigénio. Estes radicais livres são indispensáveis para a sinalização de processos inflamatórios e comunicação intracelular e intercelular. Estas espécies são principalmente produzidas como subprodutos da cadeia respiratória mitocondrial em troca da produção de adenosina trifosfato (ATP) (Z. Li et al., 2016).

Quando a mitocôndria está presente num ambiente aeróbico, o tropismo dá-se no sentido de produção de ROS, em forma de anião superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidróxilo ($\text{OH}\bullet$), radical peroxil ($\text{ROO}\bullet$) e radical hidroperoxil ($\text{HOO}\bullet$) (Reuter, Gupta, Chaturvedi, & Aggarwal, 2010).

Sob condições de hipóxia a cadeia respiratória mitocondrial inicia o fabrico de espécies reativas do nitrogénio, como o óxido nítrico (NO) (Reuter et al., 2010).

As principais ROS distribuem-se em dois grupos principais, os radicais livres e a sua forma não radical como é possível observar na tabela 1, assim como, visualizar a associação de ROS e RNS com a descrição da sua origem e reatividade (Hrycay & Bandiera, 2015).

Uma consequência do metabolismo que todos os organismos aeróbios estão sujeitos, em condições de stress oxidativo, é o fato de gerar ROS. Os intermediários formados tais como o radical superóxido e o peróxido de hidrogénio, pode dar origem a diversos radicais de oxigénio tóxicos, que podem causar peroxidação de lípidos, lesões celular e afetar a estrutura de proteínas funcionais (Hrycay & Bandiera, 2015; Reuter et al., 2010).

Tabela 1. Exemplos de Espécies reativas do oxigénio - Radicais livres e não radical (Hrycay & Bandiera, 2015).

Reactive Oxygen Species	Description and/or Reactivity
Free radicals	
Superoxide radical anion, $\cdot\text{O}_2^-$	One-electron reduction state of O_2 ; formed as a byproduct of the CYP-dependent microsomal electron transport chain; also formed in reactions catalyzed by NADPH oxidases and xanthine oxidase
Hydroperoxyl radical, $\text{HOO}\cdot$	Protonated form of $\cdot\text{O}_2^-$ and more lipid soluble
Hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$	Extremely reactive; three-electron reduction state of O_2 ; primarily formed by the Fenton reaction
Peroxyl radical, $\text{ROO}\cdot$	Generated by hydrogen atom radical abstraction from a polyunsaturated fatty acid by a reactive oxygen radical species (e.g., $\cdot\text{OH}$), generating a lipid radical ($\text{R}\cdot$) that then reacts with O_2
Alkoxyl radical, $\text{RO}\cdot$	Generated by the reaction of a lipid hydroperoxide with ferrous iron or purified CYP1A2
Nonradicals	
Peroxide dianion, O_2^{2-}	Two-electron reduction state of O_2 ; primarily formed by the one-electron reduction of $\cdot\text{O}_2^-$
Hydrogen peroxide, H_2O_2	Protonated form of O_2^{2-} ; generated by dismutation of superoxide anion catalyzed by superoxide dismutase; H_2O_2 is converted to water by catalase and is utilized for generation of the more highly reactive $\cdot\text{OH}$ radical
Singlet molecular oxygen (known simply as singlet oxygen), $^1\Delta_g\text{O}_2$, abbreviated as $^1\text{O}_2$	Highly reactive; red or infrared photoemission; nonradical singlet oxygen ($^1\Delta_g\text{O}_2$) is generated from the radical singlet oxygen state ($^1\Sigma_g^+\text{O}_2$) initially formed from triplet $^3\text{O}_2$
Ozone, O_3	Toxic oxidizing species formed in air

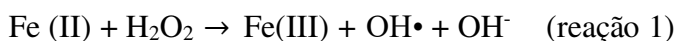
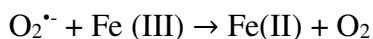
Enquanto algumas destas espécies podem ser altamente reativas no organismo interagindo com lípidos, DNA e proteínas, outras são reativas somente com os lípidos. Existem ainda algumas espécies pouco reativas o peróxido de hidrogénio mas com a capacidade de gerar espécies nocivas (Galadari, Rahman, Pallichankandy, & Thayyullathil, 2017; Hrycay & Bandiera, 2015).

O anião superóxido é considerado uma ROS primária, que é rapidamente convertida em peróxido de hidrogénio pela ação da superóxido dismutase (SOD). A carga negativa desta espécie derivada de oxigénio impede a capacidade de se transportar entre membranas, à exceção dos canais aniónicos transmembranares. O $\cdot\text{O}_2^-$ desempenha funções no sistema imunológico que conseqüentemente recorre a uma extensa produção

deste metabolito para mecanismos dependentes de oxigénio na degradação de microrganismos patológicos. Apesar de não ser um oxidante forte, é considerado um precursor de outras espécies como o peróxido de hidrogénio, o radical hidróxilo e peróxinitritos (Hrycay & Bandiera, 2015) (Galadari et al., 2017).

O peróxido de hidrogénio tem facilidade em atravessar a membranas pelo seu carácter lipofílico, sendo útil na sinalização celular e é crucial no estado redox do meio. O peróxido de hidrogénio não é propriamente uma espécie reativa, contudo a sua capacidade de atravessar membranas conjuntamente com o seu poder oxidante torna esta espécie um potencial perigo para a estrutura celular (Toyokuni, 2016).

Na presença de ferro, o peróxido de hidrogénio origina ($O_2^{\cdot-}$) e ($OH\cdot$) num processo denominado reação de Fenton (Toyokuni, 2016):



Na figura 3 é possível visualizar a conversão do anião superóxido em peróxido de hidrogénio através da SOD, que posteriormente pode ser convertido no radical hidróxilo pela reação de Fenton ou neutralizado em água pela a ação de catálases (Galadari et al., 2017).

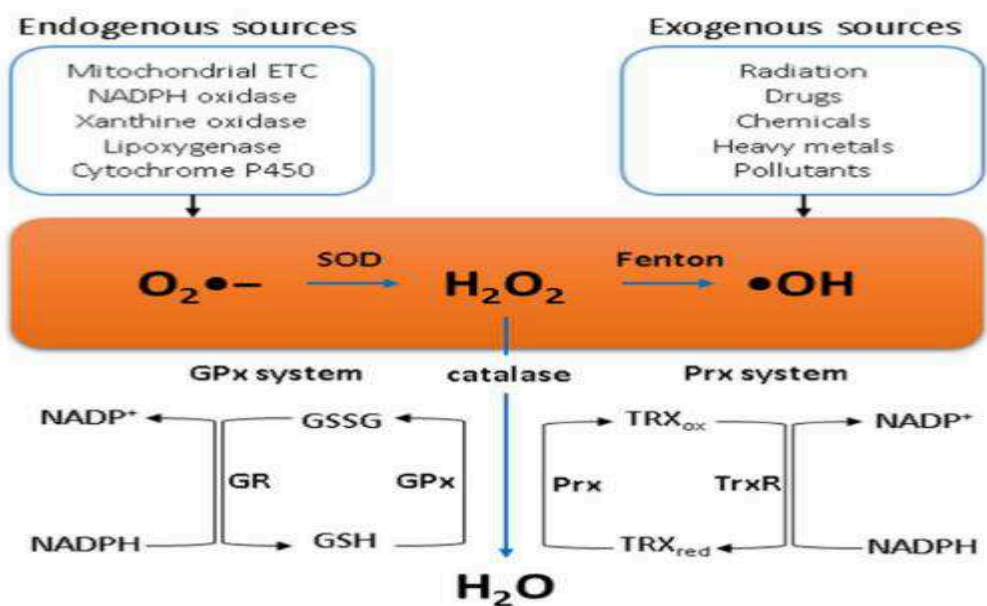
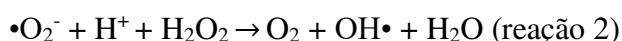


Figura 3 - Representação das fontes e conversão de ROS (adaptado de Galadari et al., 2017)

O radical hidróxilo é a espécie reativa com maior potencial oxidante e por isso o seu tempo de semivida é muito reduzido. É a espécie reativa que mais dano provoca, especialmente a nível do DNA (Galadari et al., 2017).

Para além da reação de Fenton, com uma magnitude bastante inferior, o radical hidróxilo pode ser obtido através da reação de Haber-Weiss:



O $\text{OH}\bullet$ Também pode ser produzido a nível hepático, por reações oxidativas realizadas por enzimas-CYP. Como o radical hidroxilo não consegue ser eliminado por reações enzimáticas, apenas pode ser neutralizado por moléculas oxidáveis adjacentes. (Hrycay & Bandiera, 2015) (Z. Li et al., 2016; Toyokuni, 2016).

O radical peroxil é formado através de reações que envolvem radicais hidróxilo, onde este inicialmente adquire um protão de hidrogénio a partir de resíduos de cadeias poli-insaturadas de ácidos gordos. Consequentemente é libertado um radical de ácido gordo ($\text{R}\bullet$) que reage rapidamente com O_2 . O radical peroxil tem a capacidade de reagir, oxidando proteínas membranares, colesterol e cadeias de ácidos gordos (Hrycay & Bandiera, 2015).

2.3. Fontes de ROS

O potencial reativo destas espécies, que danificam várias estruturas celulares conduzindo a alterações funcionais, levou a uma extensa procura pelas várias vias e mecanismos possíveis de produção de espécies reativas. ROS e RNS intracelulares, são geradas através de organelos tais como, o retículo endoplasmático, as peroxissomas, a mitocôndria e enzimas como NADPH oxidase (NOX), a xantina oxidase (XO), a lipoxigenases (LOX), a cicloxigenases (COX) e o citocromo p450 (figura 4) (Galadari et al., 2017).

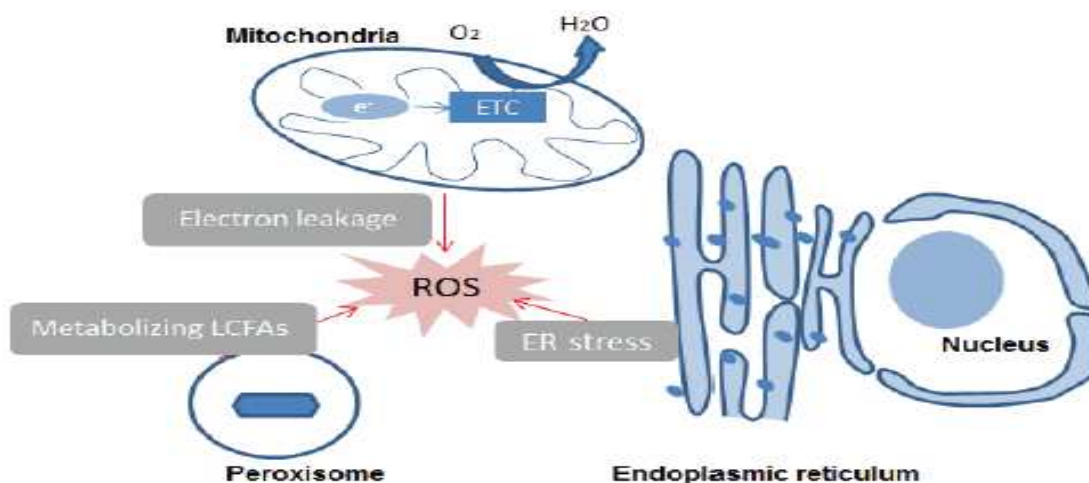


Figura 4 - Fontes intracelulares de ROS e RNS (adaptado de Gào & Schöttker, 2017)

Estes mecanismos podem ser fortemente influenciados por fontes exógenas como a exposição a radiações ultra violeta, medicamentos como citotóxicos, nicotina entre outros produtos químicos, poluentes tais como, radicais livres provenientes da camada de ozono, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e compostos orgânicos voláteis provenientes de centrais elétricas, veículos a motor, incêndios e inceneração de resíduos. Fatores como a acumulação de iões metálicos, processos inflamatórios e exercício físico excessivo também tem um papel preponderante no desenvolvimento de *stress* oxidativo celular ().

2.3.1. Organelos Produtores de ROS e RNS

2.3.1.1. Mitocôndria e cadeia respiratória

As mitocôndrias (figura Y) são organelos intracelulares presentes em células eucarióticas, a sua evolução foi proposta a partir dum fenómeno endossimbiótico entre bactérias aeróbicas englobadas com células pré-eucarióticas. Desempenham um importante papel na respiração celular e consequentemente na produção de energia sob a forma de adenosina trifosfato, induzem e regulam a produção de espécies reativas do oxigénio, regulam a apoptose e sintetizam intermediários necessários à produção de biomassa (K. Purves et al., 2002; Srinivasan, Guha, Kashina, & Avadhani, 2017).

As mitocôndrias encontram-se em concentrações diferentes, proporcionalmente à necessidade metabólica de cada espécie de célula eucariota (Fuentes, Araya-Maturana, & Urra, 2019; Srinivasan et al., 2017).

Apresentam uma estrutura de dupla membrana lipídica com o espaço intermembranar a separá-las. Este organelo é limitado por uma membrana externa que contém proteínas que operam como canais de trocas iônicas, transportadores, receptores e componentes da cadeia de transporte de elétrons, e apresentam uma membrana interna com uma configuração invaginações para o interior denominadas cristas, esta membrana entra em contacto com a matriz mitocondrial, zona onde ocorre o processo de fosforilação oxidativa. Na matriz mitocondrial estão presentes, o DNA mitocondrial (mtDNA), ribossomas, grânulos e ATP sintases e enzimas que entram na fosforilação oxidativa (K. Purves et al., 2002; Lodish et al., 2014).

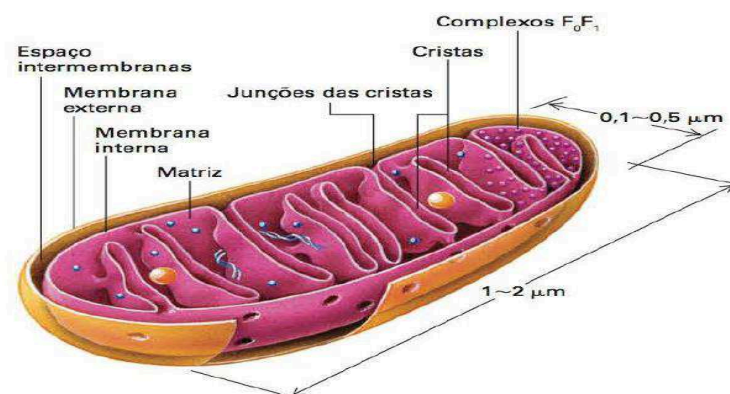


Figura 5 - Estrutura anômica da mitocôndria (adaptado de Lodish et al., 2014)

Quando o ambiente é aeróbio e a célula necessita de suprimir as suas necessidades energéticas ocorre o processo designado como respiração celular. Este processo é composto essencialmente por cinco etapas, a decomposição de glicose em piruvato pela ação de enzimas citosólicas (etapa I ou glicólise), que ocorre no citoplasma celular. Já na matriz mitocondrial os produtos da reação da etapa I como o piruvato é degradado numa coenzima, denominada por coenzima A (CoA) produzindo dióxido de carbono e acetil coenzima A (acetil CoA) (etapa II) (K. Purves et al., 2002; Lodish et al., 2014).

Parte da energia da oxidação da primeira etapa é preservada pela redução de NAD^+ para $\text{NADH} + \text{H}^+$. A reação entre o acetil CoA, e o ácido oxaloacético é o ponto

de partida para o início de inúmeras reações químicas do ciclo de ácido cítrico (etapa III) onde se promove a oxidação do grupo acetil em dois átomos de carbono, produzindo dióxido de carbono e gerando três moléculas de $\text{NADH}+\text{H}^+$ e uma FADH_2 . Posteriormente e já nas cristas mitocondriais, estas moléculas de $\text{NADH}+\text{H}^+$ e FADH_2 entram na cadeia transportadora de elétrons, constituída por ubiquinona e citocromo C (etapa IV), e composta por quatro complexos proteína-lípidos. E por fim a síntese de ATP (etapa V) pela ação da ATP sintase. (Purves et al., 2002; Moreira, 2013).

A respiração mitocondrial é constituída por quatro complexos proteína-lípidos que conectam o movimento de elétrons ao bombeamento de prótons, até chegar a gênese de ATP, sendo eles o complexo I (NADH-ubiquinona oxireductase), o complexo II (succinato-CoQ redutase), o complexo III (CoQH₂-citocromo c oxidoreductase) e por fim o complexo IV (citocromo c oxidase) (Ferreira, Aguiar, & Vilarinho, 2008; Moreira, 2013).

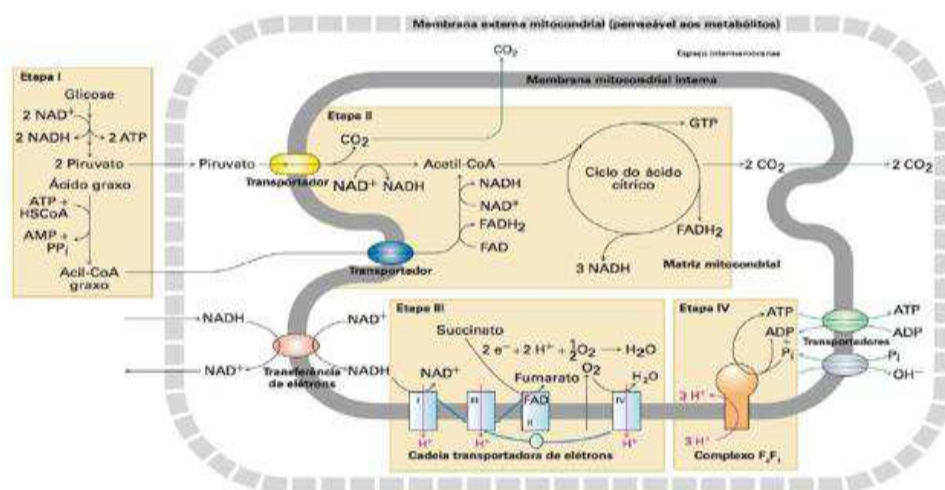


Figura 6 - Resumo da oxidação aeróbica de ácidos gordos e da glicólise (Lodish et al., 2014)

2.3.1.1.1. Complexo I

No complexo I (NADH-ubiquinona oxireductase), os elétrons de alta energia transportados pelo NADH e FADH_2 (na etapa III) são transferidos para coenzima Q-citocromo c (Complexo III), favorecida pela atuação do complexo NADH-CoQ redutase (figura 6) (Ferreira et al., 2008; Lodish et al., 2014; Moreira, 2013).

Este complexo (figura 2) encontra-se na face interior da membrana interna, é formada por quatro subunidades e apesar do diferencial energético ser negativo, a energia libertada é insuficiente para bombear prótons para o espaço intermembranar (Lodish et al., 2014).

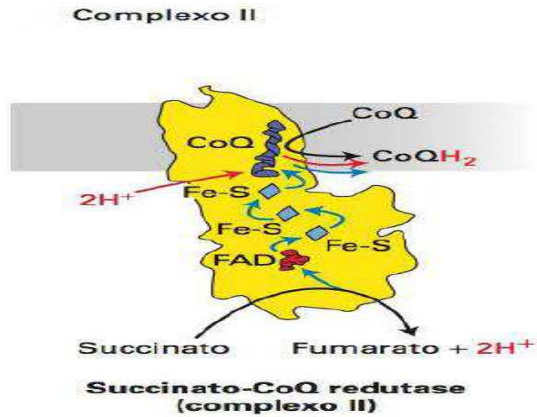


Figura 8 - Resumo do caminho efetuado pelos prótons e elétrons no complexo II ((adaptado de Lodish et al., 2014)

2.3.1.1.3. Complexo III

O Complexo III também conhecido por CoQH_2 -citocromo c oxireductase composto por onze subunidades, realiza uma série de eventos denominados ciclo Q (figura 9) (Lodish et al., 2014).

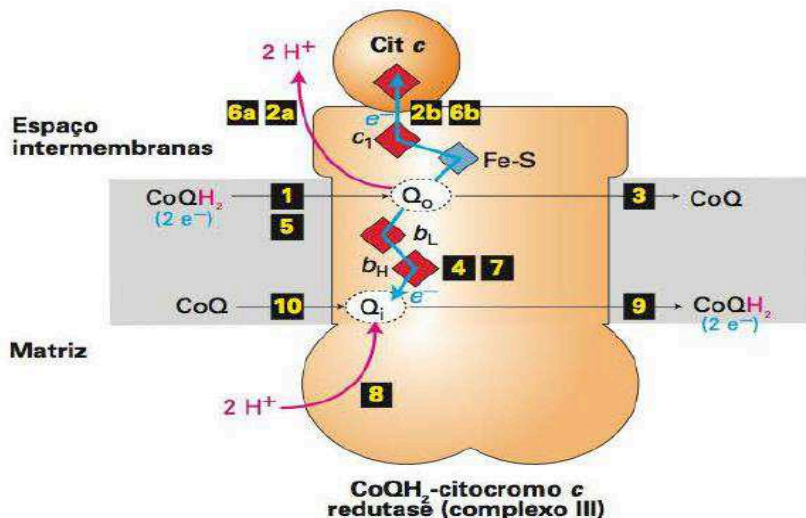


Figura 9 - Resumo do ciclo Q do complexo III mitocondrial (adaptado de Lodish et al., 2014)

Desta forma, ocorre uma reação de oxidação da CoQH₂ gerada anteriormente no complexo I ou no complexo II, estes elétrons são libertados no local dos condutores Q_o. Estes condutores transferem os elétrons para os centros de Fe-S ou de forma alternativa para o citocromo b_L (Lodish et al., 2014).

Na primeira opção os elétrons chegam ao citocromo c reduzindo-o, através do intermediário citocromo c₁. Na segunda alternativa os elétrons através do citocromo b_L têm como destino a ubiquinona por meio do citocromo b_h (Lodish et al., 2014).

O diferencial energético do complexo III é suficientemente negativo para bombear 2 prótons para o espaço intermembranar por cada citocromo c reduzido (Lodish et al., 2014).

A reação global do complexo (III) dá-se por:



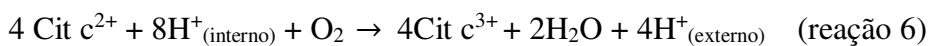
(Reduzido) (Oxidado)

(Oxidado) (Reduzido)

2.3.1.1.4. Complexo IV

O último complexo na cadeia transportadora de elétrons é o complexo IV ou citocromo c oxidase, e é constituído por treze subunidades distintas mas aparentemente o processo catalítico apenas ocorre em 3 subunidades.

A reação que expressa o complexo IV é:



(reduzido)

(oxidado)

Citocromo c oxidase vai reoxidar as moléculas de citocromo c reduzido produzidas no complexo III, enquanto os elétrons são transferidos do citocromo c para o O₂ aceitador final na cadeia. Para a haver redução de O₂ em H₂O é necessário oito prótons, em que, quatro são bombeados pela subunidade 1 e quatro disponíveis no substrato da matriz mitocondrial, como demonstrado na figura 9 (Lodish et al., 2014).

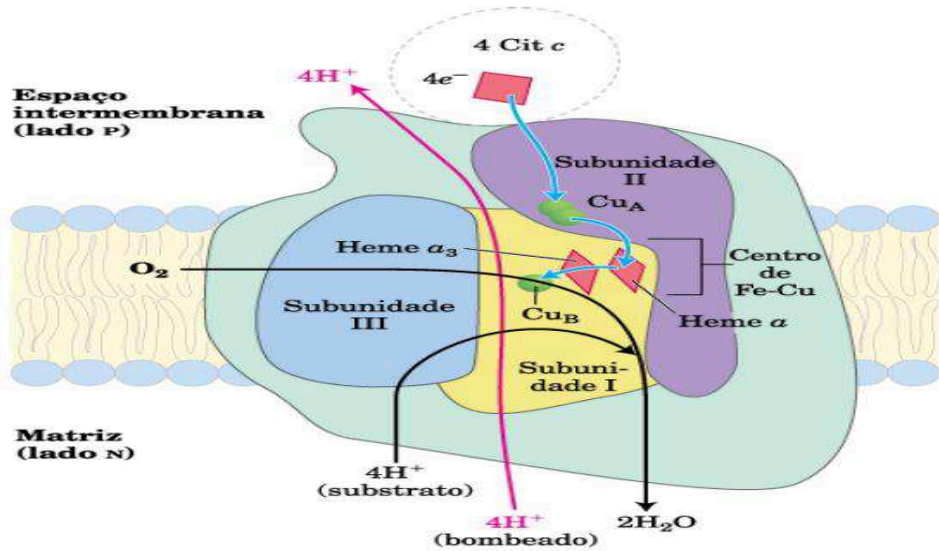


Figura 10 - Fluxo de prótons e elétrons no complexo IV mitocôndria (adaptado de Lodish et al., 2014).

A subunidade 1 está diretamente ligada aos grupos heme dos citocromos a e a₃ e a um centro de cobre (Cu_b²⁺) a sua função é aceitar elétrons e redirecioná-lo para o oxigênio. A subunidade 2 composta por centro de cobre (Cu_a²⁺) e é o ponto de ligação do citocromo c reduzido, redirecionando os elétrons para o citocromo a localizado na subunidade 1. A subunidade 3 cede oxigênio para o interior do complexo IV possibilitando assim todos os materiais necessários para produção de água e de energia. Neste complexo forma-se espécies derivadas do oxigênio que ficam ligadas ao centro binuclear formado pelo grupo (Cu_b²⁺) e o citocromo a₃ (Lodish et al., 2014).

Como referido anteriormente a mitocôndria é considerada a principal fonte de ROS e RNS, como consequência da transferência de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial. Estima-se, mediante a cadeia de transporte de elétrons, os complexos com maior contributo para à gênese de ROS é a NADH-ubiquinona oxireductase (complexo I) e ubiquinona-citocromo c oxireductase (complexo III) (Gào & Schöttker, 2017).

A instabilidade genómica no DNA mitocondrial (mtDNA) e no DNA nuclear provocada por excesso de ROS pode levar a alterações metabólicas mitocondriais, conduzido à inflação destas moléculas (Gào & Schöttker, 2017).

Estas alterações metabólicas têm sido sistematicamente associados a uma grande diversidade de neoplasias, devido à produção acrescida do anião superóxido por mitocôndrias mutadas (Galadari et al., 2017).

2.3.1.2. Reticulo endoplasmático

Outra estrutura responsável pela produção de ROS e RNS é o retículo endoplasmático. Organelo indispensável na função celular eucariota, é constituído por uma rede extensa de microtúbulos. O compartimento interior do RE, conhecido como *lúmen*, é separado e diferente do citoplasma que o rodeia. Existem dois tipos de RE, o rugoso e o liso. Esta denominação é atribuída à presença de ribossomas na fase externa das suas membranas, conferindo um aspeto rugoso quando observado ao microscópio eletrónico. Da sua responsabilidade é englobada, o processo de enrolamento de proteínas, biossíntese, translocação (Farooqi et al., 2015; K. Purves et al., 2002).

As proteínas entram no RE, de forma a iniciar o processo de enrolamento. Quando este processo não ocorre num período de tempo específico, as proteínas são reencaminhadas para a via de degradação dos lisossomas ou proteólise (Zeeshan, Lee, Kim, & Chae, 2016).

No momento em que a homeostase celular é comprometida, sucede a agregação de proteínas não enroladas levando a um estado de *stress* do retículo endoplasmático. De forma a restaurar o equilíbrio, o organismo recorre a uma cascata de reações, denominada de resposta à proteína não enrolada, que funciona como uma resposta citoprotetora. Em casos extremos de *stress* do RE a resposta à proteína não enrolada pode desenvolver características citotóxicas, induzindo a célula à apoptose (Zeeshan et al., 2016).

Por meio de uma rede complexa de intermediários o retículo endoplasmático em condições de *stress* pode promover a produção de ROS e RNS. A sua associação a este tipo de espécies estende-se também pela libertação de iões nomeadamente o ião cálcio que potencia a produção de ROS e RNS derivadas dos fenómenos mitocondriais (Tse, Yan, Chan, Tian, & Huang, 2016)

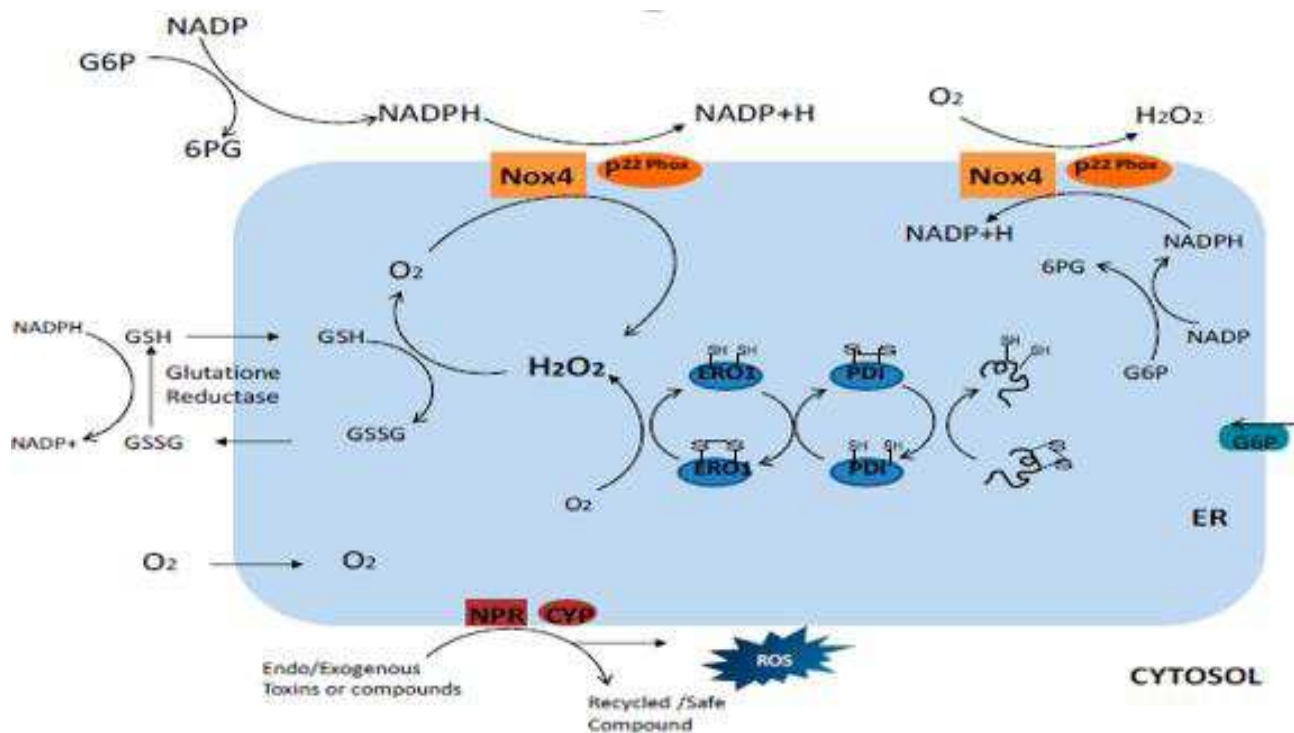


Figura 11 - Representação da comunicação redox do retículo endoplasmático (adaptado de Zeeshan et al., 2016)

2.3.1.3. Peroxissoma

O peroxissoma, é mais um organelo celular que se insere no grupo de produtores de espécies reativas, é delimitada por uma única membrana, sendo que em alguns casos, apresentam uma estrutura cristalina interna denominada de nucleóide. Esta estrutura é formada pela acumulação de uma determinada enzima peroxissômica, a urato oxidase, que se cristaliza no seu interior. Este organelo tem um papel polivalente e importantíssimo não só na produção como também na decomposição de ROS e RNS (Antonenkov, Grunau, Ohlmeier, & Hiltunen, 2010).

O alto teor de enzimas oxidativas, tais como a D-aminoácido oxidase e a urato oxidase, que se encontram armazenadas nos peroxissomas são responsáveis pelo consumo peroxissômico de O_2 e pela produção do anião superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidróxilo e óxido nítrico (Schrader & Fahimi, 2006).

A urato oxidase é uma enzima presente na maioria dos animais, exceto na espécie humana. Este facto ocorre devido à presença de mutações de genes e impede a codificação

de urato oxidase funcional. Estima-se que a perda de atividade desta enzima esteja associada a fator protetor contra ROS (Schrader & Fahimi, 2006).

Dentro das enzimas peroxissômicas, a acetil-CoA oxidase entra na β -oxidação de cadeias longas de ácidos gordos, contribuindo para a formação H_2O_2 e acetil-coenzima A, que posteriormente é enviada para o citoplasma celular podendo ser utilizada em reações de síntese ou para o fornecimento de energia nas mitocôndrias. Estes, dois exemplos demonstram uma pequena parcela da infinidade de enzimas que habitam nos peroxissomas entrando em vários processos do metabolismo celular (Antonenkov et al., 2010; Schrader & Fahimi, 2006).

2.3.2. Enzimas Produtoras de ROS e RNS

2.3.2.1. NADPH-oxidase (NOX)

O complexo enzimático denominado NADPH-oxidase (NOX) é composto por sete moléculas distintas, (NOX 1-5) e duas moléculas homólogas, dupla oxidase (DUOX 1-2). Estas espécies de enzimas encontram-se acopladas à membrana plasmática (Gào & Schöttker, 2017)

Inicialmente acreditava-se que haveria exclusividade das NOX's em células fagocitárias com função protetora do hospedeiro contra microrganismos, no entanto foram encontradas numa infinidade de células diferentes, incluído no epitélio neoplásico do pulmão. A NOX 4 é expressa em células endoteliais do córtex renal e em células no cancro do pulmão, cérebro e ovários. Enquanto a NOX1 e DUOX2 estão inteiramente ligadas ao carcinoma coloretal, cancro pancreático e doenças inflamatórias intestinais (Han et al., 2016).

A responsabilidade de produção de ROS é repartida em cada membro da família NOX, o anião superóxido é produzido pela NOX 1-3 e NOX 5, em contra partida o peróxido de hidrogénio é do encargo NOX 4 e DUOX1-2 (Han et al., 2016).

A produção de ROS e a interferência de vias de sinalização celular causadas pela sobre expressão de NOX1 está associada na inibição de fatores de supressão tumoral como a p53 (Gào & Schöttker, 2017).

2.3.2.2. Cicloxigenases (COX)

As cicloxigenases (COX) são enzimas essenciais em processos inflamatórios e outras condições fisiopatológicas, existem três isoformas desta enzima, que são expressas por genes diferentes, COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-3 é uma derivação da COX-1, contudo não é expressa em humanos (Gào & Schöttker, 2017).

Ambas são expressas na grande maioria dos tecidos, e participam na síntese de eicosanoide através da metabolização do ácido araquidônico, originando posteriormente prostaglandinas e tromboxanos. Estes são derivados de cadeias de ácidos gordos que regulam vários processos e funções a nível microscópico, como a nível macroscópico (Kumar, Kumar, & Kaur, 2012).

As prostaglandinas por sua vez, desempenham um papel fundamental na promoção e na resistência tumoral, devido à sua ação pró inflamatória (Gào & Schöttker, 2017).

Apesar da COX-2 ser codificada em vários tecidos distintos, esta enzima é quase indetetável e a sua expressão é fortemente influenciada por citocinas, endotoxinas e outros fatores de transcrição. Foram relatadas, várias associações desta isoforma a processos inflamatórios patogénicos, como doença a inflamatória pulmonar (Kumar et al., 2012)

Desta forma, cicloxigenase é cada vez mais um fator a contabilizar na pesquisa de novas terapêuticas para o cancro, não só pelo seu papel no processo inflamatório mas também pela produção de hidroperóxidos lipídicos (Kumar et al., 2012).

O consumo de glutathione reduzida por parte das enzimas cicloxigenases provoca *stress* oxidativo e conseqüentemente incitam respostas inflamatórias através da ativação de fatores de transcrição como NF- κ B, AP-1 e STAT-3 (Gào & Schöttker, 2017).

2.3.2.3. Lipoxigenase (LOX)

O ácido araquidônico é similarmente metabolizado por lipoxigenases (LOX) à semelhança da cicloxigenase. No entanto, distintamente das COX, as lipoxigenases

originam leucotrienos, outros eicosanoides derivados de cadeias de ácidos gordos e ROS como subproduto da oxidação (Cho, Seo, & Kim, 2011).

No ser humano, foram encontradas seis enzimas funcionais e diferenciadas de lipoxigenases, 5-LOX, 12-LOX, 12R-LOX, 15-LOX, 15-LOX-2 e ELOX-3, esta classificação dá-se pela posição de inserção do oxigênio no ácido araquidônico (Gào & Schöttker, 2017).

Existem três tipos bem definidos de 12-LOX, as plaquetárias, as leucocitárias e as epidérmicas. Apesar de os detalhes do mecanismo de sinalização entre 12-LOX e NOX não serem bem estabelecidos, estas lipoxigenases conseguem mediar a produção e migração de ROS através da NADPH-oxidase. Existem vários relatos da atuação 12-LOX no adenocarcinoma do colon através da instigação de NOX (Cho et al., 2011).

A 5-LOX sendo a isoforma com maior número de estudos, também está envolvida na produção de leucotrienos e ROS através da metabolização do ácido araquidônico. Especificamente os eicosanoides da LOX-5 estão associados à proliferação celular e angiogénese. Para além disso a sua sobre expressão está envolvida em várias doenças oncológicas e neurodegenerativas. A ativação descontrolada LOX-5 é ainda envolvida em crises oxidativas nos fibroblastos (Catalano, Rodilossi, Caprari, Coppola, & Procopio, 2005; Gào & Schöttker, 2017).

Devido ao carácter de atuação das enzimas que entram no metabolismo de ácido araquidônico, anti inflamatórios não esteroides como a ácido acetilsalicílico, naproxeno e ibuprofeno, inibidores seletivos da COX -2 como etoricoxib e celecoxib, e anti-leucotrienos como o montelucaste, são consideradas, cada vez mais, princípios ativos com maior potencial naquela que se acredita ser uma nova gama de terapias anti tumorais (Cho et al., 2011; Gào & Schöttker, 2017).

2.3.2.5. Óxido nítrico síntases (NOS)

A família enzimática de óxido nítrico síntases (NOS) é a principal fonte de espécies reativas de nitrogênio, catalisam o aminoácido L-arginina, originando radicais de óxido nítrico como produtos da reação. Este grupo enzimático é constituído por três principais isoformas, NOS neurais (nNOS), NOS endoteliais (eNOS) e NOS indutíveis

(iNOS). A forma nNOS distribui-se principalmente pelo tecido neurológico desempenhando funções sinalização neuronal, a segunda forma localiza-se nos tecidos endoteliais do sistema vascular, entrando em mecanismos de regulação de pressão arterial, estas são extensivamente reguladas e estimuladas pela interação entre Ca^{2+} e calmodulina, enquanto iNOS, concentram-se nos macrófagos e neutrófilos, dependendo assim de estimulação imunológica, expressando-se em altos níveis sob condições fisiopatológicas, contribuindo para mecanismos de morte celular (de Oliveira et al., 2017; Figueroa et al., 2016; Schrader & Fahimi, 2006).

2.3.2.6. Citocromo P450

O grupo de enzimas classificado por citocromo p450 é uma fonte indispensável de espécies reativas derivadas do oxigênio. Estas enzimas desempenham funções de metabolização de compostos endógenos e xenobióticos, são conhecidas na comunidade farmacêutica por metabolizar fármacos, drogas entre outros produtos químicos. Crê-se que ao longo do tempo, o aumento dos níveis de oxigênio atmosférico levaram a uma evolução destas enzimas em organismos multicelulares. A atividade desta família enzimática é dependente da performance e da concentração de NADPH, oxigênio molecular e do sistema de transporte de elétrons (Hrycay & Bandiera, 2015) .

Na espécie humana, as CYP localizam-se no retículo endoplasmático liso, peroxissomas e citoplasma, encontram-se em vários tipos de células sendo com maior relevância nos hepatócitos e em certos órgãos como timo, pâncreas e intestino (Go, Hwang, & Choi, 2015).

Estas enzimas, desencadeiam a redução de hidroperóxidos biológicos, dentro dos quais, hidroperóxidos lipídicos, hidroperóxidos esteroides, hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. Funcionam como oxidases terminais no final da cadeia de transporte de elétrons. O grupo prostético *heme* contido nas CYP desempenha um papel indispensável na atividade enzimática, local onde são recebidos elétrons, anteriormente adquiridos por parte da flavoproteína NADPH. A atividade do citocromo p450 é cada vez mais relevante no equilíbrio do plano de patologias neoplásicas, não só devido à sua capacidade de produzir ROS como também na metabolização e interação com fármacos

destinados ao tratamento do cancro (Hrycaj & Bandiera, 2015; Khan, Wajid, & Khan, 2016).

2.4. Antioxidantes

OS níveis elevados de ROS podem desencadear carcinogénese e em toxicidade extrema pode levar a morte da célula (Moloney & Cotter, 2018).

Para equilibrar esses níveis o organismo utiliza moléculas antioxidantes de origem enzimática e não enzimática. Os antioxidantes são essenciais para manter a homeostase celular e permitir a sobrevivência e sinalização celular normal. As células cancerígenas apresentam níveis de ROS mais elevados comparativamente com células normais, esta diferença resulta na estimulação de produção de antioxidantes na tentativa de contrabalançar o acréscimo de *stress* oxidativo. Em suma, quando ocorre um desequilíbrio do ambiente celular, a célula desencadeia várias reações de modo a ativar diversos mecanismos de defesa. A figura 12 representa a produção e regulação de ROS (Moloney & Cotter, 2018; Prasad, Gupta, & Tyagi, 2017).

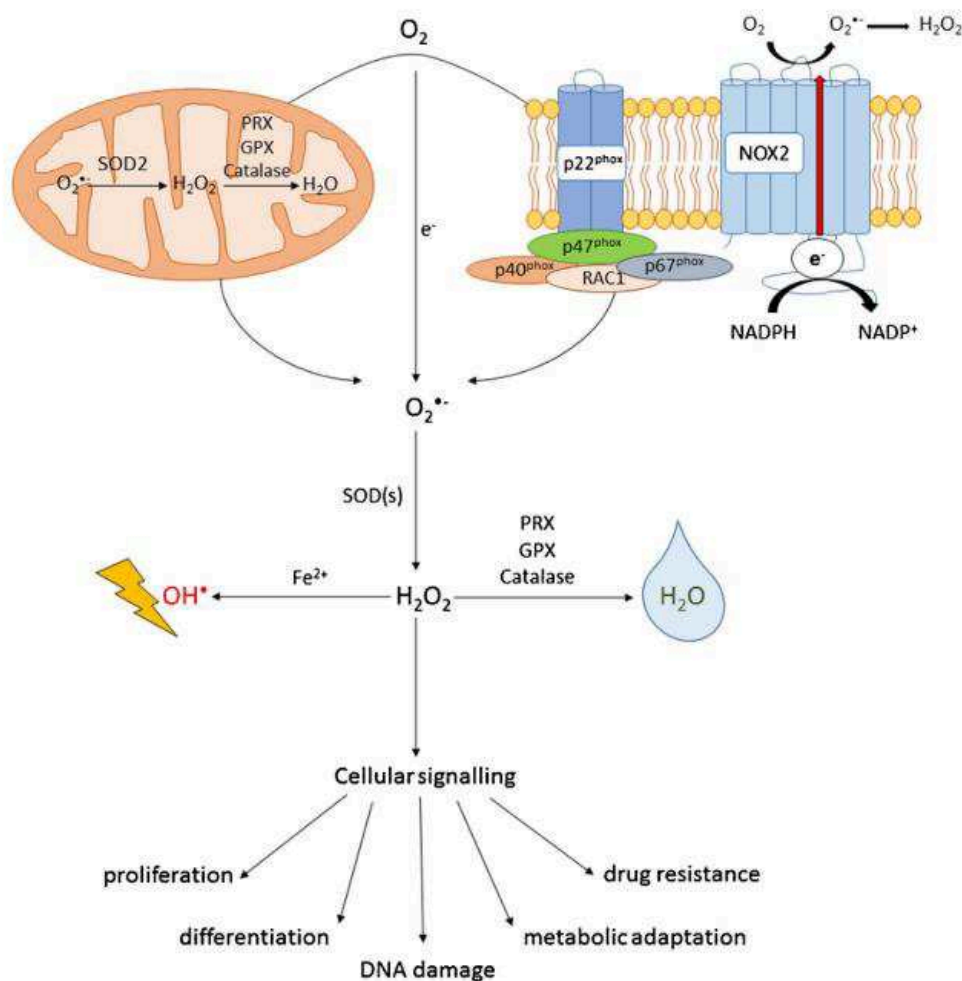


Figura 12 - Representação da produção e regulação de espécies reativas do oxigênio (adaptado de Moloney & Cotter, 2018)

A defesa celular antioxidante compreende mecanismos de prevenção, onde se impede a reatividade dos radicais livres, mecanismos de reparação, que se envolvem na interrupção de reações de oxidação e por fim mecanismos de inativação que englobam a eliminação de estruturas danificadas (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

Desta maneira, os antioxidantes dividem-se em dois grupos, os endógenos e exógenos (antioxidantes provenientes da dieta). Dentro do grupo dos antioxidantes endógenos, ainda se podem dividir em enzimáticos e não enzimáticos. Moléculas não enzimáticas compreendem vitaminas (C e E), flavonoides, albumina, transferrina, glutathiona, enquanto partículas enzimáticas incluem, a superóxido dismutase (SOD), superóxido redutase (SOR), catálase, glutathiona peroxidase (GPX), peroxirredoxina (PRX) e tiorredoxina (TRX). Estas moléculas são responsáveis por eliminar espécies

reativas do oxigénio como o peróxido de hidrogénio e o anião superóxido, por eventos de redução, de modo a manter os níveis necessários à sinalização celular (Moloney & Cotter, 2018).

2.4.1 Primeira linha de defesa antioxidante

A primeira linha de defesa antioxidante atua na prevenção de formação de espécies reativas sendo responsável pela limitação da produção de ROS, como demonstrado na figura 13. Esta gama de antioxidantes inclui proteínas não enzimáticas de ligação metálica, como a ceruloplasmina, ferritina, transferrina e albumina, que sequestram iões metálicos de transição, detendo a capacidade do organismo em promover a formação de espécies reativas. Para além das moléculas mencionados anteriormente, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) e peroxirredoxinas (PRX) também representam um papel crucial na prevenção da formação de moléculas reativas (Ighodaro & Akinloye, 2018).

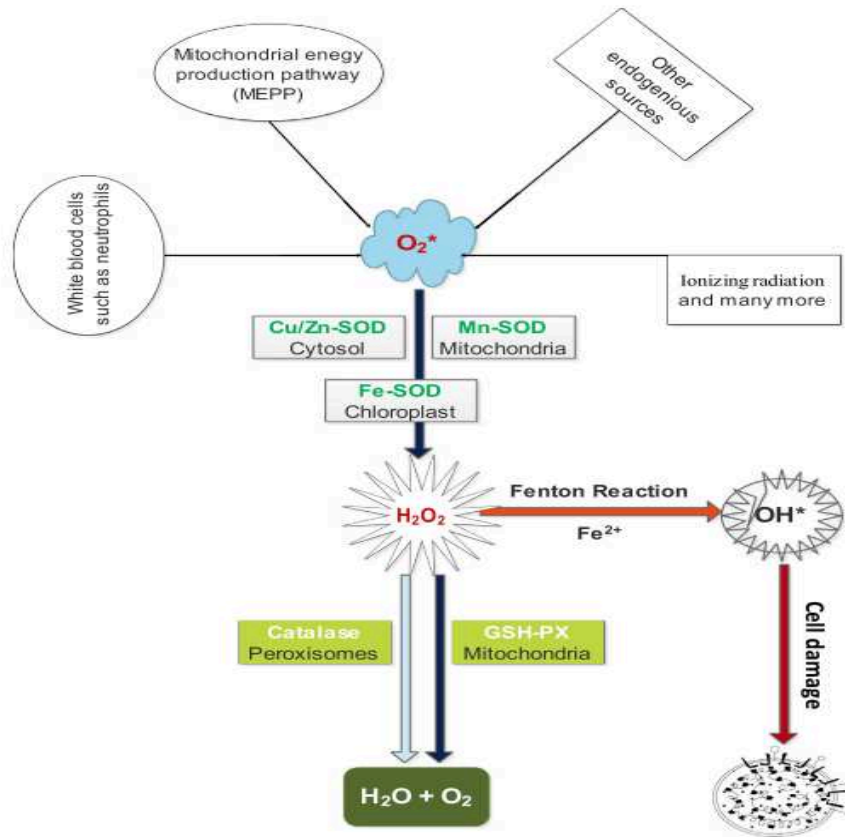


Figura 13 - Representação da primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (adaptado de Ighodaro & Akinloye, 2018)

Dentro dos antioxidantes endógenos, a superóxido dismutase assume relevância pelo fato de reduzir o anião superóxido em peróxido de hidrogênio. Existem três isoformas de SOD, como, a superóxido dismutase que contém cobre/zinco (SOD1), encontrada no citosol, a superóxido dismutase que contém magnésio (SOD2) presente na parte interna da mitocôndria e a superóxido dismutase extracelular (SOD3) (Moloney & Cotter, 2018).

Os restantes antioxidantes endógenos assumem a responsabilidade de neutralizar o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e em moléculas de oxigênio. As propriedades primárias dos antioxidantes surgem pela presença de grupos bissulfetos (-SH) nestas moléculas (Babula et al., 2012).

2.4.2 Segunda linha de defesa antioxidante

A segunda linha de defesa envolve antioxidantes não enzimáticos, e são caracterizadas por serem capazes de inativar rapidamente espécies reativas e partículas oxidantes, tais como, ácido ascórbico, ácido úrico e glutatona como hidrofílicos e tocoferol e ubiquinol como lipofílicos (Muftuoglu, Mori, & Souza-Pinto, 2014).

2.4.3 Terceira linha de defesa antioxidante

A terceira linha de defesa atua sobretudo nos danos causados por espécies reativas, empregando mecanismos de reparação. Estes mecanismos acontecem pela ação de antioxidantes enzimáticos que para reparar alterações no DNA, proteínas danificadas, interromper a propagação de radicais peroxil-lipídicos, consertar moléculas celulares danificadas e combater lípidos oxidados. (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

Ighodaro & Akinloye (2018) preconiza a existência de uma possível quarta linha de defesa, descrevendo antioxidantes envolvidos em mecanismos de adaptação que utilizam sinais necessários à produção e à reação de radicais livres, que impedem a reação destes. Estes sinais induzidos pelos próprios radicais livres promovem a formação e o transporte de antioxidante para o local certo (Ighodaro & Akinloye, 2018).

A nutrição tem uma grande influência na função antioxidante. Na dieta encontram-se várias formas de antioxidantes exógenos como os polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos), vitaminas (E e C), carotenoides e alguns minerais como o zinco, cobre e selênio. Estes por norma encontram-se em frutas, vegetais, frutos secos e bebidas como chá e café. O trabalho conjunto destas substâncias com os antioxidantes endógenos é um fator chave para a defesa e saúde celular. Os seus benefícios também incluem o atraso de senescência celular e ajuda em diversas patologias como doença cardiovascular e diabetes (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018; Zujko, Witkowska, Waśkiewicz, & Sygnowska, 2012).

Selecionando a linha de antioxidantes endógenos não enzimáticos, as proteínas de ligação metálica como a albumina, ceruloplasmina, metalotioneínas, ferritina,

mioglobina, transferrina e lactoferrina, foram os primeiros antioxidantes endógenos relatados e são os principais responsáveis pelo aporte antioxidante no plasma (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

As propriedades dos antioxidantes endógenos não enzimáticos são explicadas pela capacidade de ligação a íons metálicos. Estes quando estão em estado redox podem ser excessivamente pró-oxidantes reagindo com peróxido de hidrogénio catalisando formação de espécies reativas derivadas do oxigénio na reação de Fenton. Algumas destas proteínas como a albumina conseguem ser verdadeiras sequestradoras de espécies reativas, devido a grupos de cisteína livres. Desta forma acabam por ser responsáveis pela eliminação de radicais hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018; Taverna, Marie, Mira, & Guidet, 2013).

Já a transferrina, a ferritina e a lactoferrina atuam como inibidores de radicais livres que constituem a reação de Fenton. Em contra partida, a ceruloplasmina pode atuar como um inibidor de espécies reativas ligando-se a íons metálicos como Cu^{2+} e Fe^{2+} (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

Outros exemplos de antioxidantes internos não enzimáticos são:

- A Coenzima Q_{10} que tem a sua atividade no transporte de eletrões tanto na cadeia respiratória mitocondrial como no transporte de eletrões fora da mitocôndria. Tem ainda um papel importante nas reações redox das desidrogenases, citocromos e outras proteínas não-*heme*. Esta encontra-se na maioria dos tecidos e as suas características antioxidantes reproduzem-se apenas na sua forma reduzida ubiquinol (CoQ_{10}H) que permite a sua ligação com moléculas de hidrogénio, formando radicais livres de ubisemiquinona ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$). Estes radicais por sua vez têm propriedades antioxidantes capazes de reagir com formas de oxigénio molecular e potenciar a redução do tocoferol (forma reduzida de tocoferol apresenta fortes características antioxidantes). Normalmente, baixas concentrações séricas de coenzima Q_{10} , estão associadas a doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e cancro. Alguns estudos demonstram benefícios clínicos na utilização de suplementos com CoQ_{10} , em utentes com doença arterial coronária, bem como na prevenção antioxidante contra o enfarte agudo do miocárdio, pela capacidade de diminuir o *stress* oxidativo e pela capacidade de aumentar a atividade de enzimas

antioxidantes (Bentinger, Tekle, & Dallner, 2010; Blatt & Littarru, 2011; Cooney et al., 2011; Mirończuk-Chodakowska et al., 2018);

- Outro antioxidante endógeno não enzimático é a glutathiona (GSH) que é um composto de baixo peso molecular e constituído por três aminoácidos como a glicina, a cisteína e o ácido glutâmico. Tal como a coenzima Q₁₀, a GSH também é sintetizada em muitos tecidos distintos, no entanto, produzem-se mais nos hepatócitos. As moléculas de glutathiona podem apresentar-se na sua forma reduzida ou na sua forma oxidada, sendo a primeira a forma a mais prevalente. Estas moléculas podem ser encontradas em altas concentrações no citoplasma, mitocôndria e núcleo, apresentando menores concentrações no retículo endoplasmático. Quando comparadas as concentrações de GSH o meio intracelular em relação extracelular, constata-se que existe uma maior prevalência a nível intracelular (Lowe & Lin, 2000; Samuelsson, Vainikka, & Öllinger, 2011).

O papel da GSH varia consoante a sua concentração, podendo funcionar como um potente antioxidante contra ROS, atuando nos processos de eliminação e de desintoxicação de xenobióticos, assim como em processos inflamatórios através de mecanismos metabólicos de prostaglandinas e leucotrienos. Dentro das suas funcionalidades como antioxidante a glutathiona atua em várias linhas de defesa contra o *stress* oxidativo, podendo participar na eliminação de espécies reativas e ao mesmo tempo, atuar em processos de reparação tanto em células danificadas, como em proteínas ou até mesmo regenerar pequenas moléculas como vitamina C e E (Alli, Kehinde, Kosoko, & Ademowo, 2014; Chatterjee, 2013; Maiuolo, Oppedisano, Gratteri, Muscoli, & Mollace, 2016; Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

- O ácido úrico é também um composto orgânico não enzimático de baixo peso molecular que atua como antioxidante hidrofílico. Este é gerado durante os processos metabólicos das purinas. O ser humano ao contrário de outras espécies é incapaz de metabolizar o ácido úrico, usufruindo da sua grande capacidade de eliminação de uma alta porção de espécies reativas, incapacitando a génese de radicais livres através da inibição da reação de Fenton e Haber-Weiss. Além disso, o ácido úrico promove proteção a várias enzimas antioxidantes, como a superóxido

dismutase quer seja a nível intra ou extracelular. No entanto, a hiperuricemia, elevados valores de ácido úrico, está associada a patologias cardiovasculares, insuficiência renal, diabetes de mellitus, hipertensão, arterial e cardiopatia isquêmica (Ekpenyong, 2014; Lippi, Montagnana, Franchini, Favalaro, & Targher, 2008; Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

- A melatonina e a bilirrubina também fazem parte desta gama de antioxidantes, sendo que, a primeira é classificada como indol e usufrui da capacidade de atravessar membranas biológicas e reagir com componentes celulares. Executa processos de eliminação de radicais livres, extremamente eficazes contra o radical hidroxilo. Para além disso a melatonina é capaz de prevenir a formação de espécies reativas através da regulação da atividade enzimas antioxidantes e estimulando outros antioxidantes endógenos não enzimáticos que metabolizam ROS (Laudon & Frydman-Marom, 2014; Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

Por outro lado, a bilirrubina é um produto de degradação da hemoglobina e outras proteínas contendo o grupo *heme*. Este produto normalmente circula pelo plasma ligado à albumina onde é posteriormente captado pelo fígado. Apesar da bilirrubina apresentar-se com propriedades tóxicas em certas condições, alguns estudos demonstram benefícios relacionados com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, sendo eficaz na eliminação de radicais peróxil (Bhutani, Wong, & Stevenson, 2016; Zelenka et al., 2016; Ziberna, Martelanc, Franko, & Passamonti, 2016).

Dentro da gama de antioxidantes enzimáticos, a família de superóxido dismutase desempenha um papel essencial na mitigação dos efeitos nocivos de ROS e alterações no seu funcionamento podem levar a condições patológicas como cancro. Como já anteriormente referenciado, as isoformas de SOD assumem relevâncias diferentes. A SOD 1 é conhecida pela catálise de superóxido para peróxido de hidrogénio, localiza-se no citosol. No entanto, estudos relatam a importância desta enzima na sinalização redox, assumindo propriedades semelhantes a um fator de transcrição nuclear, colaborando na regulação da resistência ao *stress* oxidativo (Tsang, Liu, Thomas, Zhang, & Zheng, 2014; Young, Purcell, Kuang, Charette, & Dupré, 2015).

Ao contrário da SOD1, a SOD 2 localiza-se na mitocôndria, e paralelamente às suas isoformas, a sua disfunção é associada à carcinogênese. Acredita-se que a sua

expressão depende da concentração de espécies reativas assumindo-se como um essencial mecanismo de defesa celular (Griess, Tom, Domann, & Teoh-Fitzgerald, 2017).

O meio extracelular conta com a presença da SOD3 que ao contrário das enzimas homólogas presentes no citoplasma assume um papel na transdução de sinal. A ausência de SOD3 pode influenciar negativamente os prognósticos de cancro, explicado pela perda de regulação redox no meio extracelular que auxilia de alguma forma o microambiente favorável ao progresso da neoplasia. A evidência científica indica que a sobreexpressão deste antioxidante inibe o crescimento tumoral e impede a ocorrência de metástases (Griess, Tom, Domann, & Teoh-Fitzgerald, 2017).

Um dos modelos enzimáticos mais importantes na defesa antioxidante celular é o sistema de glutatona composto por NADPH, glutatona redutase (GR) glutaredoxina (GRX). Este sistema está associado a reparação de DNA em células neoplásicas através da doação de eletrões para a ribonucleotido redutase que entra em processos de replicação de DNA (Ren et al., 2019).

A glutatona peroxidase (GPX) é capaz de reduzir peróxido de hidrogénio em água e peróxidos lipídicos aos seus correspondentes álcoois com a glutatona como dador de eletrões, impedindo a formação de ROS. Faz parte do grupo de peroxidases tiol e a sua atividade depende de micronutrientes como o selênio (Ighodaro & Akinloye, 2018).

Outro modelo enzimático eficaz contra *stress* oxidativo, é o sistema antioxidante de tiorredoxina (TRX), constituído por NADPH, tiorredoxina redutase e tiorredoxina (TRX). Estudos em células mamíferas sugerem a divisão deste sistema em TRX citosólico e TRX mitocondrial. O TRX citosólico possui mais grupos de cisteína na sua estrutura, o que permite um maior desempenho na regulação do *stress* oxidativo, comparativamente ao TRX mitocondrial. A principal função antioxidante deste sistema é demonstrada principalmente pela ativação de peroxirredoxinas (Lu & Holmgren, 2014; Ren et al., 2019).

As peroxirredoxinas (PRX) são uma família de peroxidases tiol tal como GPX, que usufruem de particularidades físicas e bioquímicas únicas diferenciando-se dos antioxidantes clássicos. A presença de PRX na célula permite a manutenção do equilíbrio redox, agindo como antioxidante ou ainda como sensor redox. Este grupo de antioxidantes encontram-se em vários compartimentos celulares, no entanto as enzimas PRX mitocondriais distinguem-se através do seu funcionamento independente,

comparativamente com as enzimas homólogas a nível citoplasmático. Apesar de existir evidências sobre a envolvimento dos PRX mitocondriais na sinalização celular, o seu verdadeiro desempenho continua em especulação na comunidade científica. Contudo a nível de redução de espécies reativas as PRX desempenham um papel fundamental na eliminação de peróxidos (Cox, Winterbourn, & Hampton, 2010; Moloney & Cotter, 2018).

A catalase é outra enzima que entra na primeira linha de defesa celular, sendo o antioxidante mais abundante nos peroxissomas de células mamíferas, e está presente em quase todos os tecidos vivos que utilizam oxigénio. A enzima utiliza ferro ou manganês como cofator catalisando a redução do peróxido de hidrogénio. Este antioxidante atua decompondo o H_2O_2 nas reações catabólicas das enzimas dismutases sendo extremamente eficaz na redução global de *stress* oxidativo. Este evento pode ser explicado pela presença de uma ligação de NADPH a cada subunidade tetramétrica da catalase. As mutações nesta enzima tem sido associadas a varias condições patológicas, incluído suscetibilidade a cancro ou uma maior pré-disponibilidade à diabetes mellitus tipo 2 (Antononkov et al., 2010; Ighodaro & Akinloye, 2018).

2.5. Stress oxidativo

Um microambiente equilibrado entre pro-oxidantes e antioxidantes é crucial para a saúde celular (figura 14). Desta forma, perante um microambiente reativo, resultante da produção de espécies reativas como ROS e RNS, o corpo humano utiliza mecanismos de proteção antioxidantes. Quando ocorre desequilíbrio as células em questão entram em *stress* oxidativo, fenómeno que provoca danos moleculares e interrupção de vias de sinalização redox. A cronicidade deste microambiente gera instabilidade genómica, danos no DNA e descontrolo da proliferação celular através dum ataque contínuo das espécies reativas às estruturas e funções celulares. Estes fatores refletem na influência direta do *stress* oxidativo em várias doenças, tais como doenças neurodegenerativas, diabetes, obesidade, inflamatórias, doenças vasculares e cancro (Reuter et al., 2010).

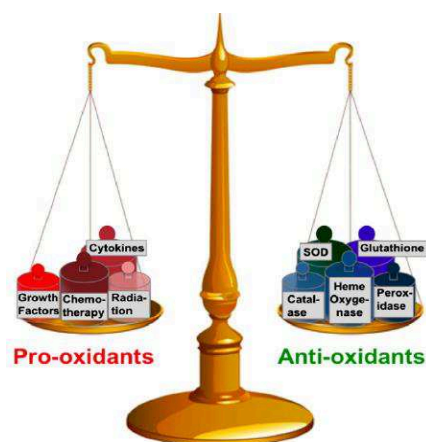


Figura 14 - Modelo do equilíbrio entre pro-oxidantes e antioxidantes (adaptado de Reuter et al., 2010)

O conjunto de patologias conhecidas como neoplasias não podem ser simplesmente reduzidas a um grande volume de células em proliferação descontrolada, estas massas celulares são constituídas por estruturas dinâmicas que efetuam um vasto espectro de atividades biológicas com requisitos metabólicos distintos. Esta variedade de valências é explicada pelo efeito Warburg, fenómeno conhecido pela produção de ATP pela glicólise aeróbia (Danhier et al., 2017; Nagao, Kobayashi, Koyasu, Chow, & Harada, 2019).

As células neoplásicas não só conseguem sobreviver à hipóxia como recorre preferencialmente à via de metabolização da glicose paralelamente à fosforilação oxidativa. Esta via apesar de ser menos competente na produção de energia em forma de ATP, é mais eficiente na produção de biomassa. Os lactatos, produtos de metabolização da glicólise diminuem o pH do meio extracelular dificultando a sobrevivência de células normais adjacentes e ao mesmo tempo facilita o carácter invasivo das células neoplásicas por ausência do espaço ocupado (Iommarini, Ghelli, Gasparre, & Porcelli, 2017).

A resistência adquirida das células neoplásicas em comparação com células homólogas sãs, não se resume só a capacidade de sobrevivência em meio extracelulares de pH baixo, a sua resiliência engloba também níveis elevados de *stress* oxidativo que são inflacionados em condições como inflamação, exposição a radiação ultravioleta, excesso de ingestão de ferro e metais pesados e à ingestão de substâncias carcinogénicas (Toyokuni, 2016).

Desta forma, o equilíbrio do estado redox é essencial nos processos responsáveis pela saúde celular. Esta coerência interfere na transdução de sinal, na proliferação celular,

na diferenciação celular e na apoptose. Contudo este estado é altamente inconstante, comprometendo o equilíbrio que é dependente do resultado de uma variação entre a exposição exógena e endógena de espécies oxidativas com a produção endógena e consumo de antioxidantes. A diferente sensibilidade a ROS por parte das células normais e cancerígenas é representada na figura 15 (Reuter et al., 2010).

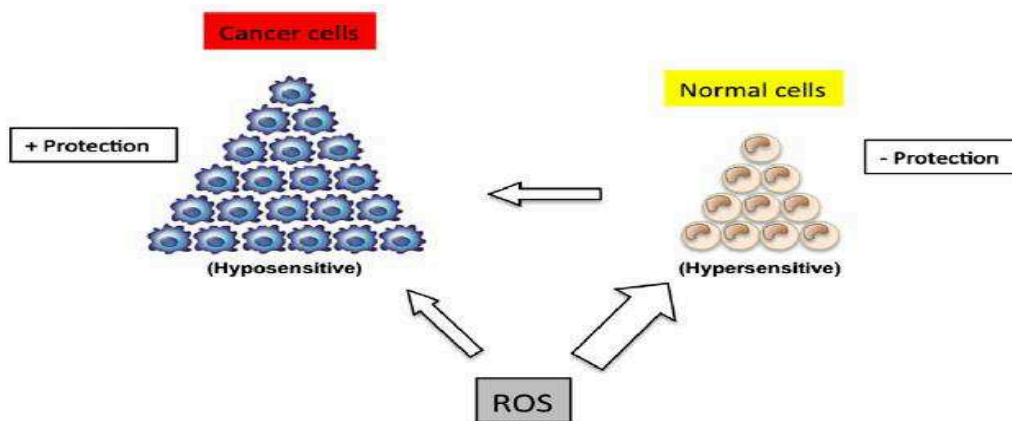


Figura 15- Representação da sensibilidade de células normais vs células neoplásicas (adaptado de Reuter et al., 2010).

2.6. O papel do microambiente celular no cancro

Há anos que a comunidade científica discute a etiologia do cancro, contudo a influência da pré-disponibilidade genética, releva a complexidade de produzir novos tratamentos. Contudo, para além do peso económico, também a dificuldade de tratar uma infindável variedade de genes associados ao cancro, se tornam indiscutivelmente gravatativos. Apesar da associação do metabolismo com o cancro já ter sido debatida num passado distante, os últimos anos revelaram a autoridade deste fator na capacidade de deteção e triagem no diagnóstico como em possíveis novos tratamentos da doença (Wishart, 2015).

Assim sendo, os radicais livres fazem parte de uma parcela importantíssima para a carcinogênese. Estas espécies reativas influenciam vários eventos biológicos, dentro dos quais, a adaptação metabólica, a proliferação celular, a diferenciação, a angiogênese, o dano e a instabilidade genómica, a autofagia, a resistência à terapia e a morte celular.

Esta influência depende diretamente da genética do cancro, das espécies reativas de oxigénio, da sua concentração e da durabilidade da exposição (Moloney & Cotter, 2018).

A intensificação da investigação sobre ROS, apresentou um papel complexo e ambíguo no que diz respeito à carcinogénese, quando estas espécies geram *stress* oxidativo, podem facilitar o crescimento celular, a proliferação e a sobrevivência através da regulação de vários fatores de transcrição e vias de sinalização bem como mutações em fatores de supressão tumoral, em contraste os níveis concentrações tóxicas de ROS conduzem à morte celular. A figura 16 demonstra o a posição da célula face a concentração de ROS (Moloney & Cotter, 2018).

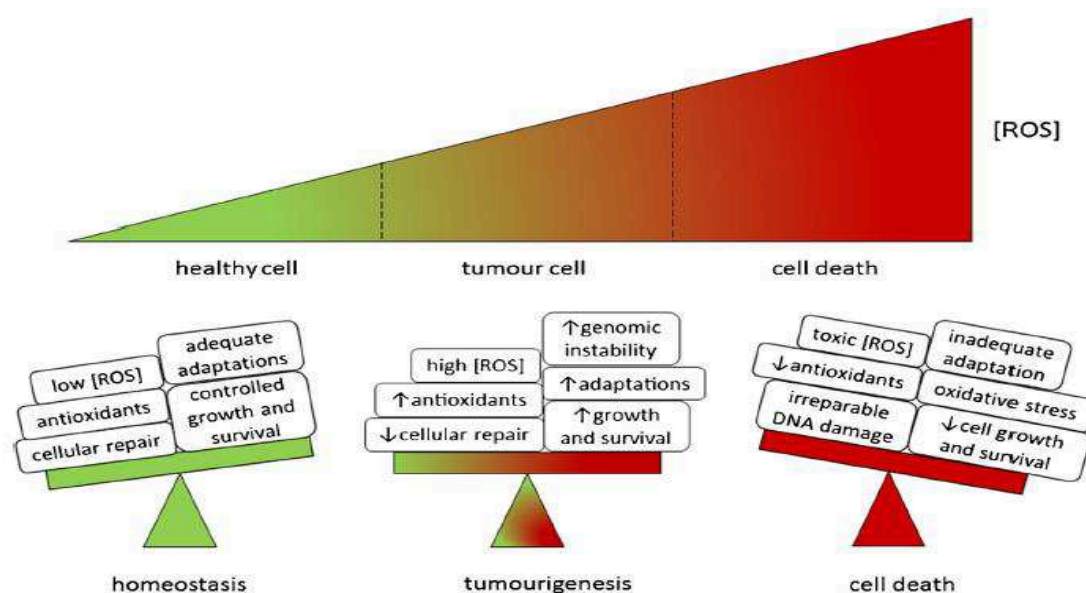


Figura 16 - Fluxograma da influencia de ROS na célula (adaptado de Moloney & Cotter, 2018)

2.6.1. A importância de ROS nas cascatas de transdução de sinal quinase/fosfatase

Os componentes que promovem as vias de sinalização consideradas críticas reguladas por ROS como a proteína tirosina fosfatase (PTP), a proteína tirosina quinase (PTK) e a proteína quinase c (PKC), ativam a família de proteínas quinases mitogénicas (MAPK) e a fosfonositídeo-3-quinase (PI3K). Quando estas vias de sinalização são afetadas pela ação de uma interface oxidativa pode levar ao descontrolo da célula. A interface oxidativa sendo os limites da concentração de ROS com capacidade de ativar moléculas de sinalização que consiste principalmente na regulação redox de resíduos de

cisteína constituinte estrutural da proteína. Estas moléculas desenvolvem transformações oxidativas que danificam a estrutura e conseqüentemente a função proteica (Glasauer & Chandel, 2014; Ray, Huang, & Tsuji, 2012).

Em conjunto estas alterações, ativam fatores e hormonas de crescimento, que só por si são insuficientes para iniciar a carcinogênese. É necessário haver um conjunto de eventos, como a adaptação metabólica por parte da célula cancerígena, que prefere o consumo de glicose explicado pelo efeito Warburg, descrito anteriormente. A resistência à hipóxia é outra das principais características numa célula cancerígena, por baixas concentrações de oxigénio e pela incapacidade de difusão em tumores não vascularizados, resultando no aumento de produção de ROS por parte do complexo III da mitocôndria. As ROS regulam a atividade dos fatores de indução de hipóxia (FIH's) através da ativação da cascata MAPK/PI3K. O aumento da expressão destes fatores é encontrado em vários tipos de tumores estando relacionados com a vascularização, invasão e metastização do tumor (Gào & Schöttker, 2017; Glasauer & Chandel, 2014).

A presença de concentrações necessárias de antioxidantes de forma evitar concentrações tóxicas de ROS, são cruciais para a adaptação da célula ao próprio *stress* oxidativo inflacionado. Não só as células cancerígenas incorporam a elevada capacidade de produção de ROS, como possuem resistência acrescida ao *stress* oxidativo. O papel da p53 na ativação de genes produtores de antioxidante é indispensável para o controlo de ROS. Quando a ativação destes genes é afetada, compromete a prevenção de danos em proteínas, lípidos e DNA (Glasauer & Chandel, 2014).

Mutações que refletem a perda da atividade da p53 são observadas em mais de 50% dos cancros diagnosticados, estando relacionados com um aumento de estresse oxidativo e crescimento drástico do tumor (Glasauer & Chandel, 2014).

2.6.1.1. A via de sinalização PI3K/AKT

Na espécie humana, dentro da família de proteínas fosfonositido-3-quinase (PI3K), existem três classes com diferentes tipos de enzimas, classe I, classe II, e classe III, sendo a primeira a mais importante nos estudos oncológicos. Quando as PI3K são ativadas fosforilam fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

que conseqüentemente atua como moléculas de sinalização de modo a recrutar proteínas contendo o domínio de homologia de pleckstrin, como a quinase-1 dependente de fosfoinosítídeos e proteína quinase B (PKB), também conhecida como AKT (Gào & Schöttker, 2017; Moloney & Cotter, 2018).

A expressão anómala de PI3K é desencadeada por fatores de crescimento e em alguns casos por ROS. Esta irregularidade encontra-se presente na maioria dos casos de cancro, com ocorrências frequentes em glioblastomas, neoplasia da mama, cancro do pulmão, tumores gastrointestinais e cancro do endométrio. Esta via está envolvida na regulação do microambiente tumoral, como capacidade de vascularização tumoral, na remodelação da matriz extracelular, na infiltração de células imunes, e na resposta imune a células malignas. Para além desta gama de capacidades, PI3K também tem implicações na proliferação, no crescimento, na motilidade, no metabolismo, na sobrevivência celular e interfere com o estágio de iniciação, na promoção e no progresso da doença (Liu et al., 2018).

Desta forma, o foco para estudos de moléculas inibitórias desta via são inevitáveis, havendo complicações em torno do real funcionamento destas, na terapêutica da doença, visto que existe várias isoformas de PI3K, que por sua vez, dividem as suas ações em anticancerígenas e procancerígenas (Liu et al., 2018).

Dentro dos mecanismos de regulação da proteína tirosina fosfatase, um dos mais apreciados é a regulação redox, mediada por estímulos de espécies reativas. Inicialmente delineou-se um carácter maligno e tóxico, contudo a produção controlada de ROS é indispensável nos processos de sinalização celular. Mecanismos de regulação de sinalização celular dependentes de fosforilação são amplamente comprometidos devido a presença de ROS, através da transfiguração de resíduos de cisteína em ácido sulfénico inativando as PTP's (Z. Yu & Zhang, 2018).

A proteína quinase B (PKB) ou AKT, juntamente com a via PI3K, também estão envolvidas em múltiplos processos celulares, e quando esta via é ativada, é diretamente relacionada com acumulação excessiva de ROS através do aumento do metabolismo mitocondrial. AKT também contém a capacidade de inibição da família de fatores de transcrição “forkhead box O” (FOXO), que promovem a defesa celular. FOXO está diretamente conectado em genes reguladores do estado redox, a paragem do ciclo celular e na apoptose (Gào & Schöttker, 2017; Moloney & Cotter, 2018).

O homólogo da fosfatase e tensina pode regular negativamente a via PI3K/AKT, contudo pelo ataque de ROS ou pela mutação do gene codificante, esta proteína supressora de tumor pode ser inativada, havendo conseqüentemente, um descontrole previsível de PI3K/AKT (Gào & Schöttker, 2017).

2.6.1.2. A influência da família de proteínas quinases mitogeno-ativadas (MAPK)

Por norma a via de sinalização MAPK consiste na ativação de três quinases sequenciais, primeiramente dá-se ativação da MAPK quinase (MAPKK) por parte da MAPK quinase quinase. Posteriormente a MAPKK vai ativar o último constituinte da cadeia MAPK (figura) . Dentro desta família existe quatro constituintes que são afetados pela presença de ROS e RNS, “c-Jun N-terminal kinases” (JNK), “Quinases reguladoras de sinal extracelular ” (ERK1/2), proteína quinase mitogénica ativada p38 (p38) e “big MAPK quinase 1” (BMK1) (Gào & Schöttker, 2017; Yang & Lee, 2011).

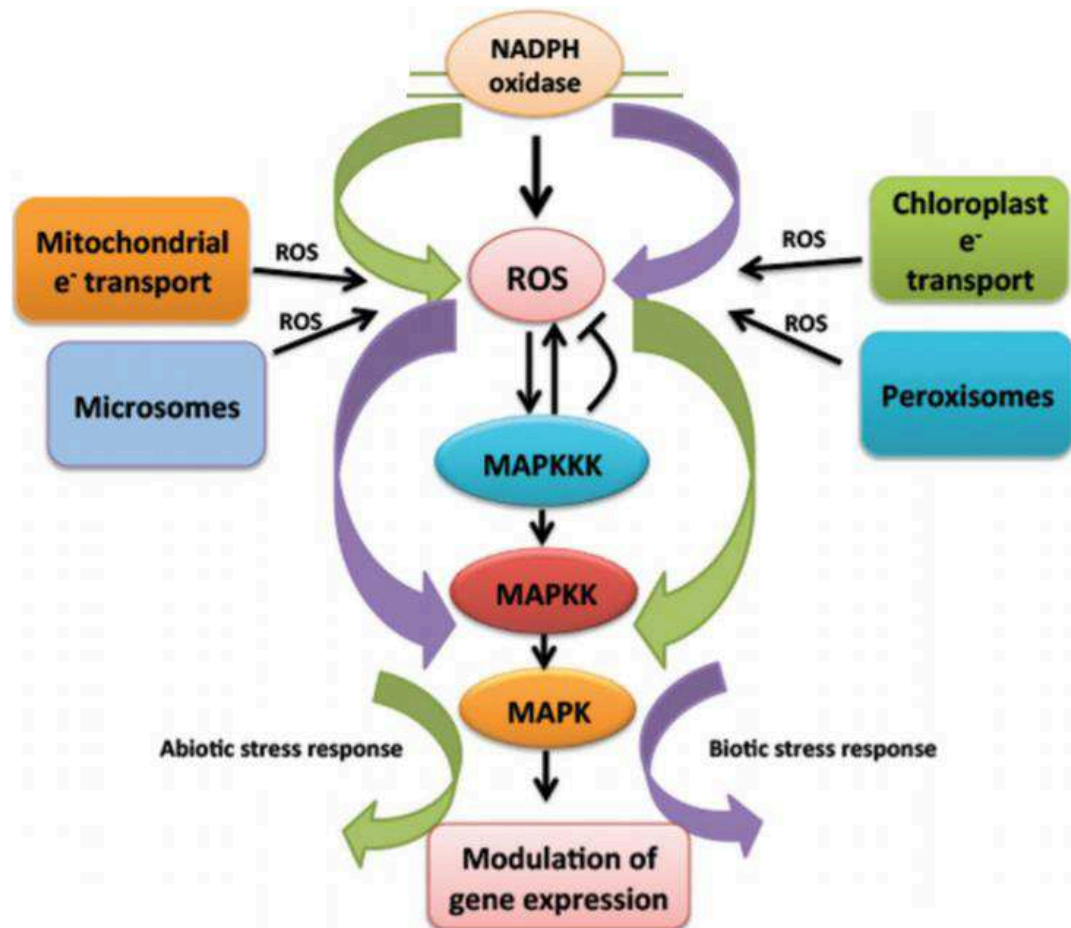


Figura 17 - Representação da influência de ROS na regulação de proteínas quinases mitogeno-ativadas (MAPK) (adaptado de Jalmi & Sinha, 2015).

A via de sinalização ERK(1/2) é ativada através de um eixo de quinases por resposta a estímulo por parte de fatores de crescimento. Esta acarreta um potencial metastático contribuindo para a disseminação da neoplasia, colaborando também com a sua proliferação. Mutações nos genes codificantes do eixo de quinases está diretamente relacionado com o desenvolvimento da doença, estando presente em várias patologias oncológicas (Gào & Schöttker, 2017; Yang & Lee, 2011).

Para além das ERK (1/2) que se ativam a partir de uma matriz de quinases com auxílio de mitógenos, as MAPK p38 e JNK também utilizam esta matriz, no entanto são mediados por fatores ambientais e processos inflamatórios como por exemplo citotóxicos e citocinas. As concentrações destas moléculas encontram-se desreguladas em vários tumores à semelhança de outras MAPK. No entanto a p38 e JNK são fortemente ligadas a eventos de inflamação bem como na homeostase celular. Diferentes tipos de células utilizam estas vias de sinalização de forma a antagonizar a proliferação celular e

diferenciação. Em contra partida as células neoplásicas revertem o normal fluxo destas vias, para seu próprio benefício, isto explica o facto de se encontrar um grande diferencial no que toca a expressão e as atividades da JNK e p38 comparativamente com uma célula normal. Estas vias são também conhecidas pela sua relação e o seu papel no progresso do ciclo celular, esta regulação dá-se por mecanismos dependentes de fatores de transcrição, bem como, mecanismos independentes destas proteínas (Wagner & Nebreda, 2009).

A resposta mediada pela via de sinalização JNK é bastante complexa, é necessário considerar o género de estímulo, a intensidade e a durabilidade de ativação compreendendo respostas desde a sobrevivência celular até a indução de apoptose. O relacionamento entre JNK e JUN é associado a uma regulação negativa do fator de supressão tumoral p53 (Wagner & Nebreda, 2009).

O percurso da p38 é correlacionada a regulação negativa do progresso do ciclo celular, através de mecanismos de sub-regulação da expressão de ciclinas ou por sobre-regulação de (CDK) que atuam como inibidores da p53, atuando tanto na transição de fase G1 para S como na transição da fase G2 para mitose (Wagner & Nebreda, 2009).

Em relação a BMK1, é expressada de forma universal nas células cancerígenas, e tal como ERK-1/2 é ativada por estímulos desencadeados por fatores de crescimento. A expressão de BMK1 permite um carácter proliferativo, de sobrevivência alterada, capacidade de resistência a tratamento citotóxico, angiogénese e poder metastático. Tal como os diferentes membros da família MAPK, BMK1 também, detém a capacidade de modular o ciclo celular nas fases G1 para S e G2 para mitose (Yang & Lee, 2011).

No presente, o panorama farmacêutico já engloba algumas moléculas experimentais inibidoras desta via, como XMD8-92, MEK5, BIX 02188, BIX 02189, contudo ainda existem estudos que revelam dúvidas sobre a sua eficácia em animais (Yang & Lee, 2011).

2.6.1.3. O Papel das proteínas tirosina fosfatase (PTFs) e proteínas tirosina quinase (PTKs)

Nas células normais, a coerência das vias de sinalização, é mantida pela coordenação das PTF's e PTK's, que consequentemente controlam a amplitude e duração

de sinal. Normalmente a interrupção destas vias advém da hiper-ativação de PTK ou da inativação da PTF (Bollu et al., 2017).

PTF é uma superfamília de enzimas, que tipicamente remove grupos de fosfato de proteínas, através da hidrólise. De acordo com as suas funções existem dois grandes grupos que dividem proteínas fosfatases supressoras de tumores que fomentam a carcinogénese por inatividade, e proteínas fosfatases oncogénicas que promovem a doença pelo crescimento abrupto de atividade. A tabela 2 cruza dados das proteínas tirosinas fosfatases, vias de sinalização afetadas, o respetivo cancro e o mecanismo que leva à redução da sua expressão (Bollu et al., 2017).

Tabela 2. Exemplos de PTF's supressores de tumor (Bollu et al., 2017)

PTP	Cancer	Mechanism for Reduced Expression	Altered Signaling Pathway
PTEN	Prostate & breast	Mutations & deletions	PI3K
INPP5J	Breast	Transcriptional repression	PI3K
SHP1	Leukemia & lymphomas	Methylation of promoter	JAK/STAT signaling
DEP1	Breast & colon	Mutations & deletions	FLT3, Erk1/2 & Akt signaling
PTPRF PTPRG PTPRT PTPN3 PTPN13 PTPN14	Colon, breast & lung	<ul style="list-style-type: none"> • Somatic mutations • Deletions • Methylation of promoter regions 	<ul style="list-style-type: none"> • PDGF, Akt and PLC • JAK and integrin • STAT3 and Paxillin • EGFR/MAPK signaling • Src signaling • YAP signaling
PTPN12	Breast	Mutations	EGFR, HER2, mTOR
PTPRK	Colon & lymphoma	Methylation of promoter	EGFR and Akt signaling
DUSP6	Leukemia, lung & liver	Methylation of promoter	MAPK signaling
DUSP4	Breast, pancreas & thyroid	Copy number loss	MAPK, JNK, Rb and NFκB
PTPRO	Leukemia, lung & breast	Methylation of promoter	P53/FOXM1

As perdas de funções associadas as PTF's supressoras de tumores são frequentemente observadas na neoplasia, devido a deleções de genes, mutações epigenéticas, promotores de metilação e supressão transcrição. Um caso bastante frequente no cancro da mama e da próstata é a presença de mutação disfuncional do gene PTEN, provocando uma ativação aberrante da via PI3K (Bollu et al., 2017).

De forma oposta as PTF oncogénicas (tabela 3), estão presentes em várias patologias neoplásicas, funcionando como oncogene para a progressão e desenvolvimento tumoral. PTPN11 primeiro PTF oncogénico descoberto, está envolvido em leucemias e cancro da mama, a inflação da sua expressão leva alteração de vias MAPK. (Bollu et al., 2017).

Tabela 3. Exemplos PTF's oncogénicas e a referente patologia oncologica (Bollu et al., 2017)

PTP	Cancer	Expression	Altered Signaling Pathway
SHP2 (PTPN11)	Breast, leukemia & gliomas	Overexpression & activating mutations	EGFR/Ras/MAPK
PTP1B (PTPN1)	Ovarian, gastric, prostate & breast	Overexpression	Src/Ras/Erk & PI3K/Akt
PTP4A3 (PRL3)	Breast, gastric & colon	Overexpression	PDGF, Integrin & EphA signaling

Moléculas inibidoras desta via podem ser bastante atrativas, no entanto, apresentam complicações, visto que é necessário uma grande seletividade tendo em conta a quantidade de subfamílias de enzimas fosfatases que detém tropismo aos mesmos recetores, desencadeando respostas adversas, podendo inibir as PTF supressoras de tumor em células saudáveis (Bollu et al., 2017).

A superfamília de proteínas tirosinas quinases (PTK) é responsável pela fosforilação da tirosina, que é uma modificação covalente resultando de processos de comunicação intercelular em organismos multicelulares. Assim sendo, as PTK catalisam a fosforilação de ATP para resíduos de tirosina acoplados a substratos proteicos. A hiperatividade das proteínas tirosinas quinases (PTK) tem sido encontrada em diversas células cancerígenas, estas exercem-se como oncoproteínas (Gào & Schöttker, 2017;).

Em relação à classificação das PTK, a superfamília pode dividir-se em duas famílias distintas, a de recetores de tirosina-quinases (RTK) e a de citoquinas não-recetoras de tirosina-quinases (NRTK). As RTK localizam-se ancoradas na superfície da membrana plasmática agindo como recetores celulares para moléculas de sinalização incluindo fatores de crescimento, hormonas, citoquinas e outros como o peróxido de hidrogénio (Regad, 2015).

As RTK's quando são ativadas através da ligação a proteínas integrinas ficam inseridas em eventos de regulação da divisão, adesão, angiogênese, motilidade e sobrevivência de células cancerígenas (Gocek, Moulas, & Studzinski, 2014).

A família de recetores tirosina quinase compreende várias subfamílias como o recetor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), que se liga ao fator de crescimento endotelial vascular, induzindo vasculogênese e angiogênese em tumores sólidos, recetores do fator de crescimento epidérmico, recetores do fator de crescimento de fibroblastos e recetores do fator de crescimento de hepatócitos também incorporam a família de RTK (Gocek et al., 2014; Regad, 2015).

A representação das vias de sinalização desencadeadas por RTK no cancro são imprescindíveis, levantando o poder terapêutico dos inibidores destes recetores. A interrupção da ativação das vias de sinalização associadas ao recetor tirosina quinase é conseguida através de anticorpos monoclonais seletivos a RTK, que atuam ligando-se ao domínio de tirosina quinase do RTK impedindo a auto-fosforilação e consequentemente a descontinuação de transdução de sinal (Regad, 2015).

Em vários géneros de malignidades é encontrado mutações que envolvem os RTK, ou componentes das vias de sinalização ativadoras de RTK como as MAPK's e P13K/AKT, resultando num descontrolo da proliferação, da sobrevivência e da invasão celular. Desta forma a segmentação das vias de sinalização RTK geram um grande desafio quer no contexto de investigação quer no contexto clínico (Regad, 2015).

Regad (2015) preconiza que existem vários exemplos de fármacos que atuam nas várias subfamílias destes recetores como descrito na tabela 4 (Regad, 2015).

Tabela 4. Exemplos moléculas anticancerígenas direcionadas à via de sinalização RTQ (adaptado de Regad, 2015).

Target	Compound	Cancer
EGFR family		
HER2	Trastuzumab (Herceptin)	HER2-positive breast cancer
EGFR	Cetuximab (Erbix) Panitumumab (Vectibix) Gefitinib (Iressa) Erlotinib (Tarceva)	Metastatic colorectal cancer (RAS wild type) Metastatic non-small-cell lung cancer
EGFR and HER2	Lapatinib (Tykerb) Afatinib	HER2-positive breast cancer (Trastuzumab-resistant) NSCLC HER2-positive breast cancer
VEGFR	Sorafenib (Nexavar) Sunitinib (Sutent) Bevacizumab (Avastin)	Renal, liver and thyroid cancer Renal cell cancer Gastrointestinal stromal tumor (GIST) Metastatic colorectal carcinoma
PDGFR	Imatinib (Gleevec)	GIST (KIT+)
PDGFR and VEGFR	Sunitinib Soratinib Pazopanib Nilotinib	Angiogenesis
FGFR and VEGFR	Brivanib (BMS-540215)	Human hepatocellular carcinoma model
VEGFR, PDGFR, FLT-3, c-KIT and FGFR	CHIR-258 (TKI-258)	Multiple myelomas
MET	SGX523	MDCK and A549 cells and GTL16 xenograft models
C-KIT	Imatinib (Gleevec)	GIST

Como se pode observar na tabela 4, existem vários princípios ativos capazes de inibir uma larga gama de subfamílias de RTK, como por exemplo o imatinib que pode inibir o recetor do fator de crescimento de células estaminais (também conhecido C-KIT), tendo influência nos tumores de estroma gastrointestinais controlando a proliferação celular e a manutenção da sobrevivência da célula cancerígena. O recetor do fator de crescimento endotelial vascular pode ser inibido bevacizumab havendo assim um controlo metastático do carcinoma colorretal, ou ser inibido por sorafenib no tratamento do cancro renal, hepático e tiroide. O brivanib também é inibidor do recetor de fator de crescimento endotelial vascular atuando na angiogênese e vasculogênese limitando a progressão do cancro (Regad, 2015).

Tal como a classe dos recetores tirosina quinase, o bom desempenho da classe da família de citoquinas não-recetoras de tirosina-quinases é fundamental na saúde celular.

A desregulação ou alteração da expressão celular também está fortemente ligada à origem de células malignas (Gocek et al., 2014).

A classe NRTK é uma componente necessária às vias de sinalização, que estão envolvidas em várias funções celulares, sendo responsáveis pela regulação da apoptose, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Gocek et al., 2014).

Apesar de existirem várias subfamílias de NRKT, a SCR é o maior grupo dentro das proteínas NRTKs, inserindo-se na regulação da via PI3K desenvolvendo resposta biológica celular associada a mobilidade celular (Gocek et al., 2014).

A proteína quinase C abrange uma numerosa família de serina/treonina quinase, incluindo 3 subfamílias de isoenzimáticas. A primeira, PKC's convencionais dependentes de cálcio (Ca^{2+}) de diacilglicerol (DAG) e fosfolípidos para a sua ativação. A segunda, nova PKC apenas requer DAG. Por fim a terceira, PKC atípica nome justificado pela independência tanto de DAG quanto de Ca^{2+} . ROS e RNS podem modular PKC através de um ataque alterando regiões de cisteína. Por exemplo, o peróxido de hidrogénio é capaz de ativar PKC's através de mecanismos de fosforilação enquanto, o óxido nítrico consegue inativá-la. Em contra partida PKC não só é regulada por ROS, como também, está articulada com a produção destas partículas reativas a partir da capacidade de potenciar NOX (Giorgi et al., 2010).

A PKC, também detém, a capacidade de sinalizar e controlar a expressão de genes relevantes à progressão do ciclo celular e esta implicada em múltiplos processos celulares como, proliferação, sobrevivência, invasão, metástase, angiogénese e apoptose de células cancerígenas (Garg et al., 2014).

Os níveis de expressão das isoenzimas de PKC podem estar alteradas em células malignas, contudo, por dificuldade de análise devido a seletividade imunológica, é difícil concluir um relacionamento causal da alteração da expressão e o progresso da doença. Importante referenciar que muitos dos estudos *in vitro* não tem que ser necessariamente transpostos para *in vivo*, sendo necessário mais estudos sobre a verdadeira função PKC no cancro (Garg et al., 2014).

2.6.2. Fatores de transcrição críticos na carcinogênese

Fatores de transcrição são estruturas proteicas com a capacidade de regular a expressão genética. O genoma humano expressa mais de 2000 fatores de transcrição que impulsionam o destino celular, revelam atividade desde a divisão à morte celular (Yadav, Chauhan, Zhuang, & Gan, 2018).

Estudos realizados concluem que a maioria das rotas clássicas para ativações de transcrição são reguladas por interações redox (Brigelius-Flohé & Flohé, 2011).

Dentro dos inúmeros fatores de transcrição, alguns são considerados críticos na carcinogênese, como fator Nrf2, NF-Kb, fator de indução de hipoxia (FIH), fator de supressão tumoral p53, STAT, FOXO e AP-1 (Brigelius-Flohé & Flohé, 2011; Gào & Schöttker, 2017).

2.6.2.1. Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)

O fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) é inserido em cascatas de sinalização que regulam proteínas antioxidantes, gerando resposta celular no que toca à defesa contra o ataque de espécies oxidativas, tanto de origem endógena como exógena. Em células saudáveis, têm como resposta a sua defesa quando as vias relacionadas com Nrf2 são ativadas, não só no cancro, mas em várias doenças relacionadas com a idade, como patologia neurodegenerativa. Apesar deste fator de transcrição levar a efeitos duplos quanto à carcinogênese, quando ativadas em células cancerígenas, Nrf2 apresenta expressão de genes citoprotetores aumentada, levando condições fisiológicas favoráveis à proliferação celular, reprogramação metabólica e inibição da morte celular programada como consequência do aumento de sobrevivência celular (Leinonen, Kansanen, Pölönen, Heinäniemi, & Levonen, 2014).

Neoplasias com sobreexpressão de Nrf2, podem afetar a angiogênese e tendem a evitar sinalização de anti crescimento celular e sinalização apoptótica, provocando um aumento na resistência tanto na quimioterapia como na radioterapia por parte da célula (figura 18). O principal mecanismo de ação da radioterapia assim como, alguns dos princípios ativos utilizados na quimioterapia como a cisplatina, o tamoxifeno e a

doxorrubicina, é a indução de produção de ROS e RNS de modo a converter o microambiente celular favorável à autodestruição de células cancerígenas. No que diz respeito aos mecanismos de proteção contra morte celular associados a Nrf2, foram delineadas duas propostas, o aumento de enzimas antioxidantes e a interação com proteínas envolvidas na apoptose (Leinonen et al., 2014; Shelton & Jaiswal, 2013).

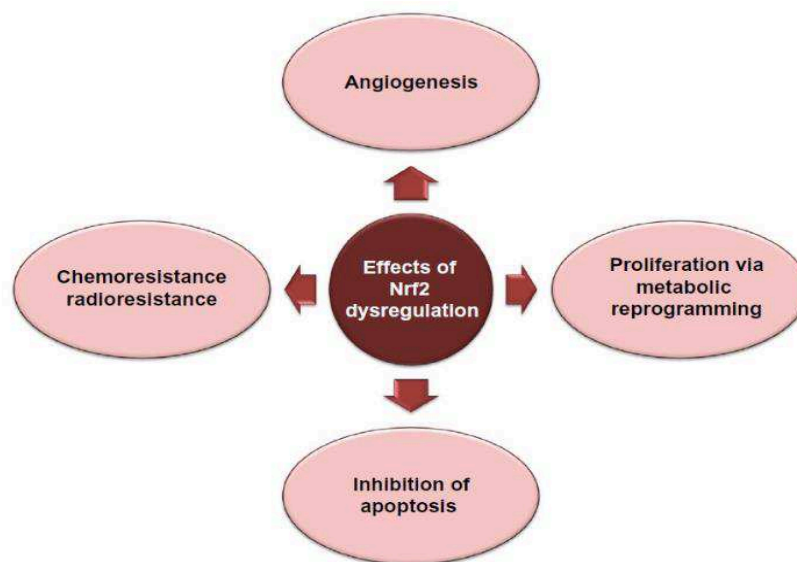


Figura 18 - Consequências oncológicas da ativação Consequente de Nrf2 (adaptado de Leinonen et al., 2014).

Desta forma várias dúvidas foram formadas em torno da concreta função de Nrf2, tendo em conta que pode agir como supressor de tumor, visto que é o principal regulador da defesa antioxidante equilibrando as concentrações tóxicas ROS, reduzindo a instabilidade genómica e processos inflamatórios. Contudo, Nrf2 também é conhecida por regular vários genes que promovem o cancro, a capacidade de interferir com componentes antitumorogénicos refletem a capacidade oposta de Nrf2, como promotor de tumor. Um exemplo é o facto deste fator de transcrição ter demonstrado capacidade reguladora na proteína antiapoptótica Bcl-2, a capacidade de reprogramação metabólica também foi considerada crucial no crescimento neoplásico (Shelton & Jaiswal, 2013).

Apesar de Nrf2 ajudar a manter o balanço *redox*, a sua inibição é um mecanismo sedutor contra células cancerígenas dependentes de Nrf2, por evitar a progressão de cancro e provocar diminuição de resistência à quimioterapia e radioterapia por parte da célula cancerígena, levando à expectativa de coadjuvar inibidores de Nrf2 com

terapêuticas padrão. No entanto, é necessário perceber em quais dos estágios da carcinogênese Nrf2 é benéfica, bem como, os níveis de concentração desta em células saudáveis de forma evitar o descontrole do estado *redox*. Esta segmentação do Nrf2 pode melhorar significativamente a eficácia de citotóxicos e evitar potenciais efeitos adversos relacionados com os mesmos (Shelton & Jaiswal, 2013).

2.6.2.2. Fator nuclear kappa B (NF-kB)

O fator nuclear NF-kB consiste numa família de fatores de transcrição que executam funções essenciais na regulação de respostas imunológicas, inflamatórias, desempenham um papel complexo na replicação viral e atuam no estágio de iniciação e progressão do cancro (Tilborghs et al., 2017).

A ativação macrófagos associados a neoplasias, o recrutamento de células precursoras endoteliais para incentivar a angiogênese e vasculogênese, tal como a capacidade aumentada de motilidade em células neoplásicas são eventos impulsionados pela ativação do NF-kB, que contribui para a disseminação de células cancerígenas (Otto & Sicinski, 2017).

O estado *redox* tem a capacidade de regular o NF-kB, compreendendo fenómenos citoplasmáticos e nucleares na sua ativação, degradação dos seus inibidores e regulação da capacidade de ligação ao DNA influenciando a atividade transcricional (Otto & Sicinski, 2017).

Estudos mostraram que a alta atividade NF-kB concomitantemente com o acúmulo de citocinas pro-inflamatórias expressadas pelo próprio fator de transcrição, promove o microambiente procancerígeno. A sua ativação pode resultar de diferentes vias de sinalização desencadeadas por citocinas, alguns membros da superfamília de proteínas tirosina quinase como recetores do fator de crescimento epidérmico e recetores do fator de crescimento de insulina. A família de recetores do fator de necrose tumoral (rTNF) e vias de sinalização relacionadas com MAPK e PI3K/AKT também podem estar associadas a eventos de ativação do aumento de expressão de NF-kB. Níveis altos de NF-kB são menos frequentemente encontrados em cancros sólidos, contudo a sua presença foi fortemente ligada ao cancro cervical induzido por papilomavírus humano (HPV) e

cancro colorretal (Dolcet, Llobet, Pallares, & Matias-Guiu, 2005; Y. Li et al., 2017; Tilborghs et al., 2017).

2.6.2.3. Proteína ativadora-1 (AP-1)

A proteína ativadora 1 (AP-1) tem funções como, a transcrição, a modificação pós-trasducional e interações com outras proteínas. Tem sido descrita a ligação entre *stress* oxidativo e AP-1 resultando na sua regulação tanto positiva quanto negativa (Trop-Steinberg & Azar, 2017; Vurusaner, Poli, & Basaga, 2012).

A sua implicação na ciência oncológica abrange o controlo de várias células cancerígenas em diferentes géneros de cancro. Concentrações anómalas de AP-1 são encontradas em amostras de pacientes com carcinoma da mama, cancro colorretal, linfoma hodgkin provocando um potencial aumento no aparecimento de metástases. Ap-1 executa ligações a promotores de genes específicos, numa sequência específica, de maneira a ativá-los ou a inibi-los, estando envolvida na transcrição de vários genes. Ap-1 em diferentes espécies de neoplasia pode reagir como supressor de tumor ou servir de marcador para progressão de cancro (Trop-Steinberg & Azar, 2017).

2.6.2.4. Proteína STAT

O grupo de fatores de transcrição denominados STAT (“signal transducer and activator transcription”), tal como NF-kB e AP-1, também executam tarefas na resposta inflamatória, na sobrevivência e na proliferação celular. Membros desta família relacionados com a carcinogénese podem ser desencadeados por fatores ambientais extrínsecos como o tabagismo, exposição a luz solar e químicos. Foi relatado que ROS e RNS detêm a capacidade de regular positivamente e negativamente o fator de transcrição, por exemplo, o *stress* oxidativo pode inibir citoquinas constituintes vias de sinalização mediadoras de STAT através da sua oxidação. Em contrapartida o peróxido de hidrogénio demonstrou ser suficientemente apto de ativar a via através da inibição de PTK e PTP, além disso proteínas STAT a nível intracelular detêm a capacidade de migrar para dentro das mitocôndrias controlando a produção de espécies reativas e subsequentemente regular ambiente *redox* na célula (Bourgeois, Gouilleux-Gruart, & Gouilleux, 2013).

STAT também está conectado com a conversão de metabolismo, por parte da célula cancerígena, para glicólise aeróbica, apesar deste fenômeno ser dependente da regulação positiva de HIF é compartilhada responsabilidade por membros da família do fator de transcrição (Bourgeais et al., 2013).

A inflamação é uma resposta de defesa, essencialmente induzida por lesões nos tecidos, quer seja de causa física ou microbiológica, que por norma ativa fatores de transcrição como NF- κ B, STAT e AP-1, mediados por citoquinas como fator de necrose tumoral (TNF). Este fenômeno coordena proliferação celular de compensação e remodelação tecidual de forma a permutar tecidos lesados. Além disso, estudos em ratos relataram a presença de inflamação em diferentes tecidos como consequência de eventos apoptóticos anômalos. O papel da inflamação no estágio inicial do cancro bem como a progressão maligna tem vindo a ser reconhecido, pois, condições inflamatórias podem iniciar e/ou promover alterações oncogénicas e mutações genéticas e epigenéticas, além disso podem gerar um microambiente inflamatório, fértil à propagação tumoral. O trabalho conjunto de fatores pró-inflamatórios tem vindo a ser fortemente associado à resistência de tratamentos oncológicos (Annibaldi & Meier, 2018; Ji, He, Regev, & Struhl, 2019; H. Yu et al., 2009).

2.6.2.5. HIF

O fator de indução de hipóxia (HIF) tem sido considerado um fator de risco para cancro, em alguns casos associado a um mau prognóstico. Existe forte evidência que correlaciona concentrações elevadas de HIF, metástase tumoral e angiogénese (Masoud & Li, 2015).

A sua ativação tem sido relacionada com a acumulação de ROS induzidos por baixos níveis oxigénio. Estes encontram-se presentes em grande parte de tumores sólidos, devido à sua capacidade de proliferação celular descontrolada, que resulta num aumento de compressão nas estruturas adjacentes (vasos sanguíneos que são responsáveis pelo aporte de O₂), limitando assim o fornecimento de oxigénio às células localizadas no interior do tumor. Desta forma, as células em questão sentem a necessidade de se adaptar, ativando diferentes vias de sobrevivência sendo a ativação HIF-1 a mais comum (Melillo, 2006)(Masoud & Li, 2015)(Cheng et al., 2018).

Como referido anteriormente, os fatores de transcrição da família HIF são responsáveis pela alteração que ocorre no metabolismo em células malignas. Assim, a ativação HIF-1 permite à célula obter energia pela glicólise através da ativação de enzimas envolvidas no processo como por exemplo, os transportadores de glicose que sofrem um aumento de expressão. A bibliografia refere o elevado potencial transcricional do HIF-1 na promoção de angiogénese pela estimulação do fator de crescimento endotelial vascular e na metastização através da ativação de fatores de crescimento oncogénicos como por exemplo fator de crescimento endotelial (Laderoute et al., 2002).

Segundo a evidência científica a presença do efeito Warburg em células malignas mesmo em condições de oxigenação normal. Além disso alguns tumores têm uma maior afinidade pela via metabólica de fosforilação oxidativa à glicólise, fenómeno explicado pela heterogeneidade genética de cada tumor (Nagao et al., 2019).

2.6.2.6. “Forkhead Box O” (FOXO)

A família de fatores de transcrição FOXO são tradicionalmente considerados supressores de tumor, as suas funções clássicas incluem promoção da apoptose, regulação do ciclo celular, crescimento celular, autofagia, resistência ao *stress* oxidativo, reparo de DNA e recentemente, tem vindo a ser associado à normalização do metabolismo em células neoplásicas (Yadav et al., 2018).

A ativação de FOXO é complexa, havendo várias vias possíveis de mediar o fator de transcrição. O *stress* oxidativo pode afetar a ativação de FOXO através da estimulação de componentes de vias de sinalização como PI3K/AKT e MAPKs (Gào & Schöttker, 2017; Hornsveld et al., 2018; Yadav et al., 2018).

A capacidade de interrupção do ciclo celular, por parte do fator de transcrição FOXO é essencial pela sua capacidade de supressão de neoplasias, a regulação positiva de FOXO, pode interferir na transição de G1-S e G2-M. Este fenómeno explica-se pela capacidade de FOXO mediar a expressão de inibidores de CDK. Além disso, estes ainda são capazes de remodelar a função metabólica através de reprogramação da expressão genética (Yadav et al., 2018).

Estudo recentes mencionam que a influência de FOXO na inibição do efeito Warburg, leva a uma diminuição do aporte bioenergético na célula tumoral influenciando em vários aspetos a progressão de tumor (Yadav et al., 2018).

A relação deste fator de transcrição com o *stress* oxidativo engloba a manutenção do seu equilíbrio através da remodelação da expressão de antioxidantes resultando na diminuição de toxicidade de ROS. A dificuldade de segmentar a função real de FOXO, relaciona-se com o simples facto, das suas funções celulares sobreporem-se às da p53. Desta maneira, é necessário novas investigações com o objetivo de compreender melhor o papel de FOXO na longevidade da célula através da mediação de ROS (Hornsveld et al., 2018; Yadav et al., 2018).

2.6.2.7. Proteína P53

A proteína p53 conhecida como fator supressor de tumor, também é um fator de transcrição. Inicialmente foi associada à supressão tumoral através de interações com oncoproteínas virais, no entanto, a sua mutação tem sido fortemente associada a diferentes tipos de cancro em diferentes locais anatómicos. (Hornsveld et al., 2018; Labuschagne, Zani, & Vousden, 2018).

Na realidade a capacidade do fator p53 na supressão tumoral é de alguma forma atribuída a vários fatores, como a capacidade de inibir o crescimento celular, envolvendo-se em fenómenos de apoptose, através da transcrição do grupo proteínas pro-apoptóticas Bcl-2. A interferência no progresso do ciclo celular ainda inclui eventos de senescência e diferenciação celular. Para além disso, a p53 consegue suportar a integridade genómica através de funções de reparação de DNA. O metabolismo e a capacidade de influenciar o microambiente celular também entram na diversidade de funcionalidades da p53, colaborando na função saudável da mitocôndria e evitando o efeito Warburg, por inibição de transportadores de glucose, tema discutido *in vitro*. A figura 19 representa influência de ROS na p53 e conseqüentemente na sobrevivência e proliferação celular (Issaeva, 2019; Labuschagne et al., 2018).

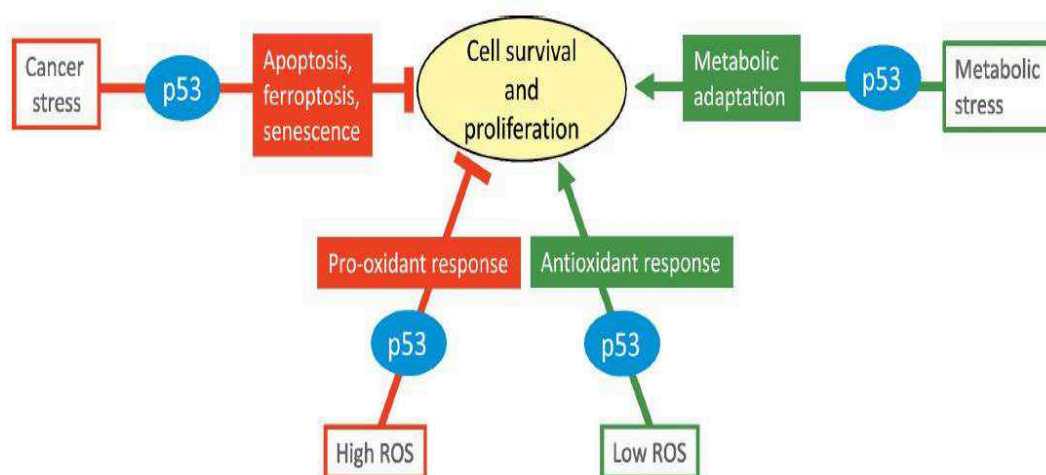


Figura 19 - Diagrama explicativo da influência da p53 na sobrevivência e proliferação celular (Labuschagne et al., 2018)

No entanto é necessário considerar que em contra partida o apoio à sobrevivência celular, em condições de homeostase normal e com estabilidade genômica, por parte da p53. No que diz respeito a eliminação celular, o papel da p53 pode ser dúbio, desenvolvendo funções críticas em diversas patologias como doenças neurodegenerativas e metabólicas (Labuschagne et al., 2018).

A ativação da proteína supressora de tumor pode ser feita a partir de sinais resultantes de danos agudos no genoma, ou desencadeado por stresses metabólicos como o *stress* oxidativo, hipóxia, e fatores de crescimento (Labuschagne et al., 2018).

Tal como a FOXO, a P53 também consegue regular os níveis de ROS através da ativação de genes pro-antioxidantes, resultando na diminuição de produção dos mesmos na mitocôndria. A p53 ainda poderá estar envolvida na ativação de genes que reprimem a produção de ROS por parte da família COX e NOS (Hornsveld et al., 2018)(Jiang, Hickman, Wang, & Gu, 2015; Labuschagne et al., 2018).

Em suma, se o sinal desencadeado pelo *stress* for transitório ou reversível, a p53 assume função protetora, garantido a sobrevivência da célula, em caso contrário, se o potencial ativador for carcinogénico a p53 recorre à apoptose, ferroptose (morte celular não programada que envolve iões de ferro) e senescência celular, de forma a impedir o progresso da malignidade. No entanto é necessário isolar o desempenho da proteína, diferenciando, o gene p53 normal e mutado, num ambiente *in vivo*, de forma a sequenciar

uma melhor abordagem sobre p53 e sua influência no cancro e em células saudáveis (Labuschagne et al., 2018).

III. Conclusão

Presentemente a carcinogénese continua a ser um processo demasiado complexo que compreende numerosas lacunas sobre a sua etiologia, devido à diversidade de fatores que podem influenciar o processo de formação de neoplasias. As espécies reativas derivadas do oxigénio integram neste vasto leque de fatores devido a sua capacidade de reagir com moléculas essenciais para o normal funcionamento celular.

Atualmente, a nossa compreensão acerca da formação de neoplasias encontra-se mais clara devido a existência de informação que coloca em causa a possibilidade de ROS possuírem a capacidade de contribuir para a carcinogénese ou para impedir o processo. Para além destas características, ROS são indispensáveis para uma correta sinalização celular. O equilíbrio entre os promotores e inibidores destas espécies é fulcral, ditando assim o destino no qual a célula ou desencadeia a apoptose ou entra na fase de iniciação do processo de formação de cancro.

Apesar de existir uma crença generalizada na atuação de antioxidantes como supressores de tumor, existe evidência científica que argumenta que o excesso de consumo destes micronutrientes pode levar a uma opressão excessiva do *stress* oxidativo e conseqüentemente comprometer a sinalização celular e promover a própria carcinogénese.

A comunidade científica ainda carece de respostas para muitos enigmas que envolvem ROS e carcinogénese. A determinação das concentrações necessárias de ROS para desencadear o processo bem como a clarificação de frequência de exposição incorporam algumas das dificuldades atualmente.

No entanto, a evolução dos estudos neste tema têm contribuído para o aparecimento de novos mecanismos de ação e naturalmente moléculas anticancerígenas que tem como base os eventos associados à ação de ROS.

Este trabalho permitiu-me despertar para a importância da realização de pesquisa científica relativamente à funcionalidade e atividade de ROS, na medida em que num futuro próximo poderão contribuir como um aliado da medicina atual no tratamento da patologia oncológica que continua a causar perdas na saúde pública bem como a representação do peso económico-financeiro em tratamentos oncológicos.

IV. Bibliografia

- Alli, J. A., Kehinde, A. O., Kosoko, A. M., & Ademowo, O. G. (2014). Oxidative Stress and Reduced Vitamins C and E Levels Are Associated with Multi-Drug Resistant Tuberculosis. *Journal of Tuberculosis Research*, 02(01), 52–58. <https://doi.org/10.4236/jtr.2014.21006>
- Annibaldi, A., & Meier, P. (2018). Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 24(1), 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.11.002>
- Antonenkov, V. D., Grunau, S., Ohlmeier, S., & Hiltunen, J. K. (2010). Peroxisomes Are Oxidative Organelles. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(4), 525–537. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2996>
- Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., ... Kizek, R. (2012). Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*, 4(8), 739. <https://doi.org/10.1039/c2mt20081c>
- Bentinger, M., Tekle, M., & Dallner, G. (2010). Biochemical and Biophysical Research Communications Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.147>
- Bhutani, V. K., Wong, R. J., & Stevenson, D. K. (2016). Hyperbilirubinemia in Preterm Neonates. *Clinics in Perinatology*, 43(2), 215–232. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.01.001>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, (January), 9–19.
- Blatt, T., & Littarru, G. P. (2011). Biochemical rationale and experimental data on the antiaging properties of CoQ10 at skin level. *BioFactors*, 37(5), 381–385. <https://doi.org/10.1002/biof.169>
- Bollu, L. R., Mazumdar, A., Savage, M. I., Brown, P. H., Prevention, C., & Young, J. (2017). *Molecular Pathways: Targeting Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer*.
- Bourgeais, J., Gouilleux-Gruart, V., & Gouilleux, F. (2013). Oxidative metabolism in cancer. *JAK-STAT*, 2(4), e25764. <https://doi.org/10.4161/jkst.25764>

- Brigelius-Flohé, R., & Flohé, L. (2011). Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(8), 2335–2381. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3534>
- Catalano, A., Rodilossi, S., Caprari, P., Coppola, V., & Procopio, A. (2005). 5-Lipoxygenase regulates senescence-like growth arrest by promoting ROS-dependent p53 activation. *The EMBO Journal*, 24(1), 170–179. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600502>
- Chatterjee, A. (2013). Reduced Glutathione: A Radioprotector or a Modulator of DNA-Repair Activity? *Nutrients*, 5(2), 525–542. <https://doi.org/10.3390/nu5020525>
- Cheng, J., Yang, H., Gu, C., Liu, Y., Shao, J., Zhu, R., ... Li, M. (2018). Melatonin restricts the viability and angiogenesis of vascular endothelial cells by suppressing HIF-1 α /ROS/VEGF. *International Journal of Molecular Medicine*, 945–955. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.4021>
- Cho, K., Seo, J., & Kim, J. (2011). Bioactive lipoxygenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *Molecules and Cells*, 32(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-1021-7>
- Conway, E. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research*, 49(3), 507–521. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00281-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00281-9)
- Cooney, R. V., Dai, Q., Gao, Y.-T., Chow, W.-H., Franke, A. A., Shu, X.-O., ... Zheng, W. (2011). Low Plasma Coenzyme Q10 Levels and Breast Cancer Risk in Chinese Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20(6), 1124–1130. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-1261>
- Cox, A. G., Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2010). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal*, 425(2), 313–325. <https://doi.org/10.1042/BJ20091541>
- Danhier, P., Bański, P., Payen, V. L., Grasso, D., Ippolito, L., Sonveaux, P., & Porporato, P. E. (2017). Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 556–572. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.02.001>
- de Oliveira, G. A., Cheng, R. Y. S., Ridnour, L. A., Basudhar, D., Somasundaram, V., McVicar, D. W., ... Wink, D. A. (2017). Inducible Nitric Oxide Synthase in the

- Carcinogenesis of Gastrointestinal Cancers. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26(18), 1059–1077. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6850>
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–44. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*, 446(5), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9>
- Ekpenyong, C. (2014). Abnormal Serum Uric Acid Levels in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *American Journal of Internal Medicine*, 2(6), 113. <https://doi.org/10.11648/j.ajim.20140206.15>
- Farooqi, A. A., Li, K., Fayyaz, S., Chang, Y., Ismail, M., Liaw, C.-C., ... Chang, H.-W. (2015). Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Tumor Biology*, 36(8), 5743–5752. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3797-0>
- Ferreira, M., Aguiar, T., & Vilarinho, L. (2008). Cadeia Respiratória Mitochondrial Aspectos Clínicos , Bioquímicos , Enzimáticos e Moleculares Associados ao Défice do Complexo I. *Arquivos de Medicina*, 22(2/3), 49–56.
- Figuroa, H., Cifuentes, J., Lozano, M., Alvarado, C., Cabezas, C., Eixarch, E., ... Irrazabal, C. E. (2016). Nitric oxide synthase and changes in oxidative stress levels in embryonic kidney observed in a rabbit model of intrauterine growth restriction. *Prenatal Diagnosis*, 36(7), 628–635. <https://doi.org/10.1002/pd.4829>
- Fuentes, E., Araya-Maturana, R., & Urra, F. A. (2019). Regulation of mitochondrial function as a promising target in platelet activation-related diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 136, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.007>
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., & Thayyullathil, F. (2017). Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine*, 104(December 2016), 144–164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004>
- Gào, X., & Schöttker, B. (2017). Reduction – oxidation pathways involved in cancer

development : a systematic review of literature reviews. *Oncotarget*, 8(31), 51888–51906.

Garg, R., Benedetti, L. G., Abera, M. B., Wang, H., Abba, M., & Kazanietz, M. G. (2014). Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene*, 33(45), 5225–5237. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.524>

Giorgi, C., Agnoletto, C., Baldini, C., Bononi, A., Bonora, M., Marchi, S., ... Pinton, P. (2010). Redox Control of Protein Kinase C: Cell- and Disease-Specific Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(7), 1051–1085. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2825>

Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.017>

Go, R., Hwang, K., & Choi, K. (2015). Cytochrome P450 1 family and cancers. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 147, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.003>

Gocek, E., Moulas, A. N., & Studzinski, G. P. (2014). Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 51(3), 125–137. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.874403>

Griess, B., Tom, E., Domann, F., & Teoh-Fitzgerald, M. (2017). Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 464–479. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.013>

Han, M., Zhang, T., Yang, L., Wang, Z., Ruan, J., & Chang, X. (2016). Association between NADPH oxidase (NOX) and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thoracic Disease*, 8(7), 1704–1711. <https://doi.org/10.21037/jtd.2016.06.31>

Hornsveld, M., Smits, L. M. M., Meerlo, M., van Amersfoort, M., Groot Koerkamp, M. J. A., van Leenen, D., ... Dansen, T. B. (2018). FOXO Transcription Factors Both Suppress and Support Breast Cancer Progression. *Cancer Research*, 78(9), 2356–2369. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2511>

Hrycay, E. G., & Bandiera, S. M. (2015). Involvement of Cytochrome P450 in

- Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. In *Cytochrome P450 function and pharmacological roles in inflammation and cancer* (1st ed., pp. 35–84). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.003>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, *54*(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Iommarini, L., Ghelli, A., Gasparre, G., & Porcelli, A. M. (2017). Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1858*(8), 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.02.006>
- Issaeva, N. (2019). p53 Signaling in Cancers. *Cancers*, *11*(3), 332. <https://doi.org/10.3390/cancers11030332>
- Jalmi, S. K., & Sinha, A. K. (2015). ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress- striking similarities and differences. *Frontiers in Plant Science*, *6*(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00769>
- Ji, Z., He, L., Regev, A., & Struhl, K. (2019). Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- κ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201821068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821068116>
- Jiang, L., Hickman, J. H., Wang, S., & Gu, W. (2015). Dynamic roles of p53-mediated metabolic activities in ROS-induced stress responses. *Cell Cycle*, *14*(18), 2881–2885. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1068479>
- K. Purves, W., Sadava, D., H.Orions, G., & Heller, C. C. (2002). *Vida A Ciência da Biologia* (6^a Edition).
- Khan, W. A., Wajid, M., & Khan, A. (2016). Cytochrome P450-Mediated Estrogen Metabolites and Autoimmunity : Relationship and Link to Free Radicals. *Current Drug Metabolism*, *17*, 65–74.
- Klaunig, J. E., & Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, *7*, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.014>
- Kumar, M., Kumar, S., & Kaur, S. (2012). Role of ROS and COX-2/iNOS inhibition

in cancer chemoprevention: a review. *Phytochemistry Reviews*, 11(2–3), 309–337. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9265-1>

Labuschagne, C. F., Zani, F., & Vousden, K. H. (2018). Control of metabolism by p53 – Cancer and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1870(1), 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.06.001>

Laderoute, K. R., Calaoagan, J. M., Gustafson-brown, C., Knapp, A. M., Li, G., Mendonca, H. L., ... Johnson, R. S. (2002). The Response of c-Jun / AP-1 to Chronic Hypoxia Is Hypoxia-Inducible Factor 1 α Dependent. *Mol. Cell. Biol.*, 22(8), 2515–2523. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.8.2515–2523>

Laudon, M., & Frydman-Marom, A. (2014). Therapeutic Effects of Melatonin Receptor Agonists on Sleep and Comorbid Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15924–15950. <https://doi.org/10.3390/ijms150915924>

Leinonen, H. M., Kansanen, E., Pölönen, P., Heinäniemi, M., & Levonen, A. (2014). *Role of the Keap1–Nrf2 Pathway in Cancer* (Vol. 122). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00008-6>

Li, Y., Lin, Z., Chen, B., Chen, S., Jiang, Z., Zhou, T., ... Wang, Y. (2017). Ezrin/NF- κ B activation regulates epithelial- mesenchymal transition induced by EGF and promotes metastasis of colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.058>

Li, Z., Pearlman, A. H., & Hsieh, P. (2016). DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair*, 38, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.019>

Lippi, G., Montagnana, M., Franchini, M., Favaloro, E. J., & Targher, G. (2008). The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*, 392(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.02.024>

Liu, X., Xu, Y., Zhou, Q., Chen, M., Zhang, Y., Liang, H., ... Wang, M. (2018). PI3K in cancer: its structure, activation modes and role in shaping tumor microenvironment. *Future Oncology*, 14(7), 665–674. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0588>

Lodish, H., Berk, A., A.Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., ... P.Scott, M. (2014). *Biologia Celular e Molecular*.

Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485–

495. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.485>
- Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., & Mollace, V. (2016). Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 213, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.109>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>
- Melillo, G. (2006). Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor 1 for Cancer Therapy. *Molecular Cancer Research*, 4(9), 601–605. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0235>
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
- Moreira, C. (2013). Respiração. *Ciência Elementar*, 1(01), 1–5.
- Muftuoglu, M., Mori, M. P., & Souza-Pinto, N. C. de. (2014). Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion*, 17, 164–181. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.03.007>
- Nagao, A., Kobayashi, M., Koyasu, S., Chow, C. C. T., & Harada, H. (2019). HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 238. <https://doi.org/10.3390/ijms20020238>
- Oncológicas, P. N. para as D. (2017). *Programa nacional para as doenças*

oncológicas. Lisboa.

Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Publishing Group*, 17, 93–115. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>

Pain, C., & Adults, I. N. (2018). *WHO GUIDELINES FOR THE PHARMACOLOGICAL AND RADIOTHERAPEUTIC MANAGEMENT OF CANCER PAIN IN ADULTS AND ADOLESCENTS*. Geneva.

Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>

Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>

Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2017). The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1), 79–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808>

Regad, T. (2015). Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers*, 7(3), 1758–1784. <https://doi.org/10.3390/cancers7030860>

Ren, X., Santhosh, S. M., Coppo, L., Ogata, F. T., Lu, J., & Holmgren, A. (2019). The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.037>

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

Samuelsson, M., Vainikka, L., & Öllinger, K. (2011). Glutathione in the blood and cerebrospinal fluid: A study in healthy male volunteers. *Neuropeptides*, 45(4), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2011.05.004>

Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755–1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006>

- Shelton, P., & Jaiswal, A. K. (2013). The transcription factor NF-E2-related Factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *The FASEB Journal*, 27(2), 414–423. <https://doi.org/10.1096/fj.12-217257>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Srinivasan, S., Guha, M., Kashina, A., & Avadhani, N. G. (2017). Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 602–614. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.004>
- Taverna, M., Marie, A., Mira, J., & Guidet, B. (2013). Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Annals of Intensive Care*, 3(4), 1–7.
- Tilborghs, S., Corthouts, J., Verhoeven, Y., Arias, D., Rolfo, C., Trinh, X. B., & van Dam, P. A. (2017). The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 120(July), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.001>
- Toyokuni, S. (2016). Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.025>
- Trop-Steinberg, S., & Azar, Y. (2017). AP-1 Expression and its Clinical Relevance in Immune Disorders and Cancer. *The American Journal of the Medical Sciences*, 353(5), 474–483. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.01.019>
- Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., & Zheng, X. F. S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature Communications*, 5(1), 3446. <https://doi.org/10.1038/ncomms4446>
- Tse, G., Yan, B. P., Chan, Y. W. F., Tian, X. Y., & Huang, Y. (2016). Reactive Oxygen Species, Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction: The Link with Cardiac Arrhythmogenesis. *Frontiers in Physiology*, 7(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00313>
- Vurusaner, B., Poli, G., & Basaga, H. (2012). Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 7–18.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.035>

Wagner, E. F., & Nebreda, Á. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 537–549. <https://doi.org/10.1038/nrc2694>

Wishart, D. S. (2015). Is Cancer a Genetic Disease or a Metabolic Disease? *EBioMedicine*, 2(6), 478–479. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.05.022>

Yadav, R. K., Chauhan, A. S., Zhuang, L., & Gan, B. (2018). FoxO transcription factors in cancer metabolism. *Seminars in Cancer Biology*, 50(October 2017), 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.01.004>

Yang, Q., & Lee, J.-D. (2011). Targeting the BMK1 MAP Kinase Pathway in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 17(11), 3527–3532. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2504>

Young, B., Purcell, C., Kuang, Y.-Q., Charette, N., & Dupré, D. J. (2015). Superoxide Dismutase 1 Regulation of CXCR4-Mediated Signaling in Prostate Cancer Cells is Dependent on Cellular Oxidative State. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(6), 2071–2084. <https://doi.org/10.1159/000438566>

Yu, Z., & Zhang, Z. (2018). Regulatory Mechanisms and Novel Therapeutic Targeting Strategies for Protein Tyrosine Phosphatases. *Chemical Reviews*, 118(3), 1069–1091. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00105>

Zeeshan, H., Lee, G., Kim, H., & Chae, H. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 327. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>

Zelenka, J., Dvořák, A., Alán, L., Zadinová, M., Haluzík, M., & Vitek, L. (2016). Hyperbilirubinemia Protects against Aging-Associated Inflammation and Metabolic Deterioration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/6190609>

Ziberna, L., Martelanc, M., Franko, M., & Passamonti, S. (2016). Bilirubin is an Endogenous Antioxidant in Human Vascular Endothelial Cells. *Scientific Reports*, 6(1), 29240. <https://doi.org/10.1038/srep29240> *al Interactions*, 188(2), 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.010>

Zujko, M., Witkowska, A., Waśkiewicz, A., & Sygnowska, E. (2012). Estimation of

dietary intake and patterns of polyphenol consumption in Polish adult population. *Advances in Medical Sciences*, 57(2), 375–384. <https://doi.org/10.2478/v10039-012-0026-6>