



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BIOMARCADORES DE STRESS OXIDATIVO**

Trabalho submetido por  
**Stephanie Morgado Simões**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**junho de 2017**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **BIOMARCADORES DE STRESS OXIDATIVO**

Trabalho submetido por  
**Stephanie Morgado Simões**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Luísa Gonçalves**

**junho de 2017**



*À minha mãe, mulher de armas, que batalhou sempre para que nada me faltasse,  
que educou, apoiou, acompanhou e acreditou  
que este momento seria possível.  
Que esta seja não só uma conquista minha mas nossa!*

*“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.*

*The important thing is to not stop questioning.”*

Albert Einstein



## AGRADECIMENTOS

Com o culminar do ciclo de estudos é chegado o momento de demonstrar o meu profundo agradecimento e gratidão a todas as pessoas que estiveram presentes e que me apoiaram durante o meu percurso académico.

Primeiramente, quero agradecer à minha orientadora Professora Doutora Luísa Gonçalves pela sua prontidão, acessibilidade, disponibilidade e paciência, bem como todos os conselhos e conhecimentos transmitidos durante a elaboração da monografia.

Ao ISCSEM e a todos os docentes do MICEF que me proporcionaram um ensino de qualidade e que me transmitiram não só conhecimentos científicos, como também todas as bases necessárias e fundamentais para a minha formação e futura profissão.

A todo o *staff* dos Serviços Farmacêuticos do Hospital Dr. José de Almeida de Cascais, desde da diretora técnica, Dra. Domingas Palma, à minha orientadora, Dra. Sónia Jorgenson, restantes farmacêuticos, técnicos, em especial à Margarida Ferreira e Xeong Cruz, e auxiliares deste serviço, agradeço a todos vós o acompanhamento, integração, sabedoria e conhecimentos transmitidos.

À Farmácia Estádio de Coimbra, agradeço à Dra. Carolina Jesus, ao Dr. André Paiva, à Dra. Ana Isabel Rebelo, às técnicas Edite Dinis e Dina Rodrigues, à Dra. Maria João Domingues, Marta Cunha Vaz e Hugo Travassos por me terem recebido carinhosamente na vossa equipa, transmitindo-me todo o seu conhecimento, apoiando e ensinando-me a ser e fazer melhor, fazendo-me crescer todos os dias como profissional e, acima de tudo, por terem estimulado ainda mais o meu gosto por esta profissão.

A todos os meus amigos mas com um carinho especial: Maria João, Ana Luísa, Joana, Telma, Ana Teresa, Ana Rita, Rui, Alexandre, Rodrigo, Miguel e João Aguiar. Agradeço-vos profundamente por todo o vosso apoio, afeto, compreensão, alegrias e tristezas partilhadas, noites de estudo e todos os momentos divertidos passados dentro e fora do contexto académico. Um grande obrigado por terem entrado na minha vida e tornado este meu percurso mais fácil e possível de ser alcançado.

Por último, e um dos mais importantes agradecimentos é à minha família. Aos meus avós maternos e padrinhos que me apoiaram incondicionalmente mas em especial à minha mãe, uma guerreira e grande mulher, que independentemente das circunstâncias da vida, com coragem e fé, lutou constantemente para me proporcionar um futuro melhor, acompanhando e acreditando sempre em mim, mostrando que seria possível a conclusão desta etapa!

A todos vós, o meu Muito Obrigado!



## RESUMO

A formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) é a principal responsável pela ocorrência de danos celulares no organismo. Estas espécies reativas são geralmente controladas pela presença de espécies antioxidantes, que ajudam a manter o equilíbrio do ambiente. Contudo, quando a ação das espécies antioxidantes para com as ROS já não é eficaz ocorre um desequilíbrio homeostático por aumento de espécies reativas, dando assim origem ao aparecimento de um mecanismo denominado de *stress* oxidativo.

O mecanismo de *stress* oxidativo pode ser desencadeado por diversos fatores, sendo eles exógenos (radiações ultravioleta, temperaturas altas, químicos e da alimentação) ou endógenos (ação mitocondrial), que independentemente do tipo de fonte, vão ter uma ação prejudicial para o ser vivo.

A principal ação destas espécies reativas de oxigénio consiste no ataque a diversas moléculas importantes do organismo, nomeadamente, a lípidos, proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA), que ao interferirem com estas moléculas vão comprometer o seu bom funcionamento, provocando danos graves nas células e, por conseguinte, o aparecimento de um vasto leque de patologias.

De modo a perceber o mecanismo de ação das ROS é necessário recorrer a metodologias analíticas e amostras biológicas específicas para efetuar a sua deteção e análise. Porém, devido à instabilidade e reatividade característica destas espécies, torna-se impossível a sua medição e, consequentemente, a perceção da extensão do dano oxidativo causado.

Assim, a utilização de biomarcadores de *stress* oxidativo torna-se uma opção viável para contornar o problema de análise das espécies reativas de oxigénio, uma vez que estes marcadores biológicos são moléculas mais estáveis, específicas e sensíveis com a capacidade de serem mensuráveis, e desse modo úteis para a compreensão da ação do *stress* oxidativo no organismo.

**Palavras-chave:** Espécies reativas de oxigénio; *Stress* oxidativo; Dano oxidativo; Biomarcadores de *stress* oxidativo.



## ABSTRACT

The formation of reactive oxygen species (ROS) is the main cause of the cellular damage occurrence in the organism. This reactive species are usually controlled by the presence of antioxidants species, which contribute to the balance of the environment. However, when the action of antioxidant species on ROS is no longer effective, a homeostatic imbalance occurs by increase of reactive species, leading to a mechanism known as oxidative stress.

Oxidative stress mechanism can be caused by multiple factors, exogenous (ultraviolet radiation, high temperatures, chemical and food) or endogenous (mitochondrial action), which action, regardless of the type of source, might be harmful to living being.

The main action of these reactive oxygen species consists on the attack of several important molecules in the organism, namely, lipids, proteins and deoxyribonucleic acid (DNA), which will compromise their proper functioning, causing serious cellular damage and, consequently, the emergence of a wide range of pathologies.

In order to understand the mechanism of action of ROS it is required analytical methodologies and specific biological samples to carry out their detection and analysis. Nevertheless, considering the instability and reactivity characteristic of these species, it becomes impossible to measure them and, therefore, to realize the extent of the oxidative damage that they cause.

The use of oxidative stress biomarkers appear to be a viable option to circumvent the problem of analyzing reactive oxygen species, since these biological markers are more stable, specific and sensitive molecules with the ability to be measurable, and, thus, very helpful in the comprehension of the action of oxidative stress on the organism.

**Key-words:** Reactive oxygen species; Oxidative stress; Oxidative damage; Oxidative stress biomarkers.



## ÍNDICE

Índice de Figuras .....	7
Índice de Tabelas .....	8
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	9
Introdução.....	13
Capítulo 1 – Biomarcadores .....	16
1.1. Enquadramento Histórico .....	16
1.2. Definição de Biomarcador .....	21
1.3. Biomarcadores e a sua aplicabilidade .....	22
1.4. Características de um Biomarcador “ideal” .....	23
1.5. Biomarcador válido.....	24
1.6. Benefícios e limitações dos Biomarcadores .....	26
1.7. Considerações éticas e sociais .....	27
1.8. Classificação de Biomarcadores .....	28
Capítulo 2 – Biomarcadores de <i>Stress</i> Oxidativo.....	31
2.1. Definição de Biomarcadores de <i>Stress</i> Oxidativo .....	31
2.2. <i>Stress</i> Oxidativo .....	32
2.3. Efeito do <i>Stress</i> Oxidativo em Lípidos, Proteínas e DNA .....	35
2.3.1. Lípidos: Peroxidação Lipídica.....	35
2.3.1.1. Biomarcadores da Peroxidação Lipídica .....	39
I. 4-Hidroxinonenal .....	39
II. Malondialdeído .....	44
III. Acroleína.....	49
IV. Isoprostanos .....	54
2.3.2. Proteínas: Oxidação Proteica .....	58
2.3.2.1. Biomarcadores de Oxidação Proteica .....	60
I. Proteínas Carboniladas .....	60

2.3.3. DNA: Oxidação de Ácidos Nucleicos.....	63
2.3.3.1. Biomarcadores da Oxidação de Ácidos Nucleicos.....	64
I. 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG) e 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5-OHdU).....	64
Conclusão .....	67
Bibliografia.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo do <i>stress</i> oxidativo. Demonstração do desequilíbrio fisiológico entre o sistema oxidativo e antioxidante provocado pela produção excessiva de espécie reativas de oxigénio (ROS).....	32
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da formação de radicais livres.....	33
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo do processo de peroxidação lipídica.....	38
<b>Figura 4.</b> Fórmula estrutural do 4-Hidroxinonenal.....	40
<b>Figura 5.</b> Fórmula estrutural do Malondialdeído.....	45
<b>Figura 6.</b> Reação entre o MDA e o TBA com conseqüente formação de um composto vermelho fluorescente (MDA-TBA <sub>2</sub> ). .....	48
<b>Figura 7.</b> Fórmula estrutural da Acroleína.....	50
<b>Figura 8.</b> Imagem esquemática da formação de F <sub>2</sub> -Isoprostanos e dos seus quatro regioisómeros.....	55
<b>Figura 9.</b> Estrutura dos grupos de carbonilo produzidos pela oxidação direta da cadeia lateral de aminoácidos .....	62
<b>Figura 10.</b> Fórmula estrutural do 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG).....	65
<b>Figura 11.</b> Fórmula estrutural do 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5-OHdU).....	66

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais acontecimentos históricos sobre a evolução dos Biomarcadores.....	18
<b>Tabela 2.</b> Identificação de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.....	34
<b>Tabela 3.</b> Imagem esquemática da fórmula estrutural do 8-iso-PGF <sub>2α</sub> e das suas três nomenclaturas.....	56

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS<sup>1</sup>

**A.C.** – Antes de Cristo

**ACR** - Acroleína

**ADH** –Álcool desidrogenase

**ALDH** – Aldeído desidrogenase

**AKR** – Aldo-ceto redutase

**AST** - Aspartato transferase

**B-on** – Biblioteca do conhecimento *online*

°C – Graus Celsius

**CEA** - Antígeno Carcinoembrionário

**CHD** – 1,3-Ciclohexanodiona

**CL** - Quimioluminescência

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**dA** – Desoxiadenosina

**dC** - Desoxicitidina

**dG** - Desoxiguanosina

**DHN** – 1,4-dihidroxi-2-noneno

**DNA** – Ácido Desoxiribonucleico

**DNPH** – 2,4-Dinitrofenilhidrazina

**DPOC** – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

**Dr.** - Doutor

---

<sup>1</sup> Devido ao carácter universal de algumas abreviaturas e siglas, a nomenclatura anglo-saxónico foi mantida para facilitar o seu reconhecimento.

**ECCG** – Eletrocardiograma

**EIA** - *Enzyme Immuno Assay*

**ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**Ex.** – Exemplo

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**FL** – Fluorescência

**F<sub>2</sub>-IsoPs** – F<sub>2</sub>-Isoprostanos

**GC-MS** – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

**GC-MS/MS** – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa sequencial

**GC/NICI-MS** - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa com Ionização química negativa

**GSH** – Glutathiona

**GST** – Glutathiona-S-transferase

**HCG** - Gonadotrofina Coriônica Humana

**HER-2** – *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*

**HIV** – *Human Immunodeficiency Virus*

**HNA** – Ácido 4-hidroxi-2-nonanóico

**HNE** – 4-Hidroxinonenal

**HO•** - Radical hidróxilo

**HPCE** – *High-Performance Capillary Electrophoresis*

**HPLC** - *High-Performance Liquid Chromatography*

**3-HPMA** – Ácido 3-hidroxipropil mercaptúrico

**H<sub>2</sub>O** – Molécula de água

**IRM** – Imagem por Ressonância Magnética

**8-iso-PGF<sub>2α</sub>** – 8-Isoprostaglandina F<sub>2α</sub>

**L•** - Radical alquilo

**LCR** - Líquido Cefalorraquidiano

**LC-MS** – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa

**LC-MS/MS** – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa sequencial

**LH•** - Ácidos gordos polinsaturados

**LMC** - Leucemia Mielóide Crônica

**LOO•** - Radical peróxilo

**LOOH•** - Radical lipohidroperóxilo

**LPO** – Peroxidação lipídica

**MDA** - Malondialdeído

**MS** – Espectrometria de Massa

**M1A** – N6-(3-oxopropenil)desoxiadenosina

**M1C** – N4-(3-oxopropenil)desoxiadenosina

**M1G** - Pirimidopurinona

**NADPH** - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*

**NH<sub>2</sub>** – Grupo Amina

**PAF-AH** – Ativador plaquetário acetilhidrolase

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction*

**PFBHA** – Pentafluorbenzil-hidroxilamina

**PFBO** - Pentafluorbenziloxima

**PUFA** – Ácidos gordos polinsaturados

**Redox** – Reação de oxidação-redução

**RIA** - *Radioimmunoassay*

**RNA** - *Ribonucleic Acid*

**RNase** – Ribonuclease

**RNS** – Espécies Reativas de Azoto

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigénio

**-SH** – Grupo tiol

**TAC** – Tomografia Axial Computorizada

**TBA** – Ácido Tiobarbitúrico

**TBARS** – *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

**TEP** – Tomografia por Emissão de Positrões

**TLC** – Cromatografia de camada fina

**US** – *United States*

**USA** – *United States of America*

**UV** - Ultravioleta

**XO** – Xantina Oxidase

**WHO** – *World Health Organization*

## INTRODUÇÃO

Desde a formação da terra, há 4,6 mil milhões de anos, que o planeta está em constante transformação e sujeito a inúmeras interações, tanto químicas como físicas. Estes fenómenos têm vindo a afetar diversas áreas no quotidiano do Homem, desde a cultura, a sociedade, a economia, o estado psicológico das pessoas e, principalmente, o meio ambiente, que posteriormente conduzirão ao aparecimento de alguns problemas (Amorim, 2003)

A existência de fatores exógenos (ozono, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, tabaco, atividade física, xenobióticos, entre outros) e endógenos (metabolismo celular) no dia a dia do Homem despoleta múltiplas reações no corpo humano, que vão influenciar positivamente ou negativamente a sua saúde. A ligação direta destes fatores com a saúde são inevitáveis e impossíveis de se desconectar, como tal é fundamental aprofundar e analisar estes mecanismos, de forma a compreender e a garantir o equilíbrio necessário para prevenir o desenvolvimento de diversas patologias (Palmieri & Sblendorio, 2007; Cotinguiba, Silva, Azevedo, Rocha, & Santos, 2013).

Os fatores supramencionados desempenham um papel importante no que diz respeito ao aparecimento de radicais livres. Os radicais livres são por norma constituídos por dois tipos de espécies, as espécies reativas de oxigénio (ROS) e as espécies reativas de azoto (RNS), sendo que ambas se encontram em meio endógeno e são produtos do normal metabolismo celular. Contudo, quando ocorre produção excessiva de espécies reativas de oxigénio, desencadeiam-se mecanismos que potenciam o dano celular, que, conseqüentemente, levam ao desenvolvimento de patologias e processos de envelhecimento, provenientes da ação de um mecanismo denominado de *stress* oxidativo (Montuschi, Barnes, & Roberts, 2004; Valko *et al.*, 2007). Este processo surge essencialmente pela ocorrência de um desequilíbrio existente entre espécies oxidantes e antioxidantes, que, pela predominância de espécies oxidativas, conduz ao dano (Azzi, Davies, & Kelly, 2004).

O desequilíbrio homeostático instalado pelo *stress* oxidativo apresenta múltiplas conseqüências, sendo que o seu problema major assenta no dano causado a nível dos lípidos, das proteínas e do ácido desoxirribonucleico (DNA), que leva a comprometer a

saúde das células e, consoante a severidade do dano, pode culminar em diversas patologias, nomeadamente aterosclerose, diabetes, problemas oftálmicos, cardíacos, pulmonares ou obesidade, que de uma forma geral vão terminar em doenças neurodegenerativas, cardiovasculares ou mesmo em eventos carcinogénicos (McCord, 2000; Abuja & Albertini, 2001; Dalle-Donne, Rossi, Colombo, Giustarini, & Milzani, 2006; Barbosa *et al.*, 2010).

Tendo em conta a ampla ação do processo de *stress* oxidativo e as suas consequências na saúde do Homem, houve a necessidade de encontrar meios que melhor explicassem os fenómenos por ele provocados.

Biomarcadores ou marcadores biológicos referem-se a qualquer entidade, substâncias, agentes químicos, células, moléculas, genes, enzimas ou hormonas corporais mensuráveis, consequentemente utilizadas como parâmetros de medição e de avaliação do normal funcionamento biológico e patológico, com a capacidade, através da sua medição, previsão e deteção do início ou progressão de doenças (Maiese, 2009; Sahu *et al.*, 2011)

Os biomarcadores, devido ao seu vasto campo de ação, têm vindo a conquistar e a marcar o seu lugar no mundo científico, destacando-se cada vez mais, de tal forma que hoje em dia se encontram envolvidos numa multidisciplinariedade de áreas, desde a medicina à genética, epidemiologia, patologia, toxicologia, farmacologia, bioquímica, estatística, saúde ambiental, entre outros (Wilson & Suk, 2002a).

Estes marcadores biológicos apresentam diversas características e vertentes, que consoante o contexto em que se encontram vão desempenhar um papel específico (Zwart, Meerman, Commandeur, & Vermeulen, 1999). Como tal, tendo em conta a sua diversidade e a problemática envolvente no processo de *stress* oxidativo, esta monografia irá abordar a temática dos biomarcadores de *stress* oxidativo.

Assim sendo, esta dissertação tem por objetivo fazer uma revisão atualizada acerca da literatura existente sobre os biomarcadores de *stress* oxidativo, incidindo, sobretudo, na clarificação de conceitos, elucidação do desempenho destes marcadores biológicos sobre a atividade oxidante/antioxidante na saúde, quais os marcadores existentes e os métodos analíticos usados para a sua deteção, monitorização e consequente avaliação.

Desta forma, para a elaboração desta monografia procedeu-se a uma pesquisa bibliográfica intensiva utilizando diversas fontes científicas, desde a consulta de livros relacionados com a temática em análise, como também outras bases de dados científicas, entre as quais: PubMed, MEDLINE, B-on, ScienceDirect, Elsevier, Sciello e Web of Knowledge, onde foi feita a pesquisa utilizando palavras-chave em língua inglesa, tais como: *biomarkers*, *biological markers*, *oxidative stress*, *free radicals*, *biomarkers of oxidative stress*, *biomarkers of lipid peroxidation*, *Protein oxidation*, *DNA oxidation*, entre outros.

Por fim, é de salientar que após a compilação e seleção de toda a pesquisa efetuada para a elaboração desta monografia, existiu o cuidado de recolher a informação mais recente possível, conseguindo obter deste modo um conjunto de 173 artigos, compreendidos entre os anos de 1948 e 2017.

## CAPÍTULO 1 - BIOMARCADORES

### 1.1. Enquadramento Histórico

O aparecimento do termo biomarcador no seio da comunidade científica é, de certo modo, um acontecimento recente. No entanto, a sua aplicabilidade é de tal forma antiga, que existe evidência sobre a utilização de marcadores no antigo Egito, por volta do ano de 1500 A.C., mencionado em manuscritos médicos, nomeadamente no papiro de Edwin Smith (baseado em trabalho realizado anteriormente por Imhotep), descrevendo que o diagnóstico e prognóstico do estado de saúde das pessoas era feito através da observação e análise de amostras biológicas (urina) e eventos físicos (frequência cardíaca e temperatura) (Ferguson & Vaidya, 2010).

Mais tarde, por volta do século VII A.C., um antigo e famoso cirurgião indiano, Sushruta Samhita, considerado o “Pai da cirurgia Ayurvédica”, que deu um grande contributo em diversos campos da medicina, colaborando também na área dos marcadores biológicos, destacou-se nesta área sobretudo pelo relato que fez acerca da deteção da diabetes através da urina, onde descreve que os doentes com esta patologia apresentam uma urina doce ao invés das pessoas saudáveis, fenómeno que explica após ter observado a atração de formigas à urina destes doentes devido ao sabor adocicado, tornando este fator presente na urina um marcador biológico para a deteção da diabetes (Arango, 2012; Dews, 2010; Dwivedi & Dwivedi, 2007; Fathi & Mesbah-namin, 2014; Ryan, Watson, & Berridge, 2004).

No século IV A.C., ou seja, 150 anos depois do relato de Sushruta Samhita, o desenvolvimento e avanço dos meios de diagnóstico e prognóstico de doenças através da observação de amostras biológicas, continuaram a ser um foco de estudo na Grécia antiga, onde Hipócrates, “Pai da Medicina” e fundador da área da urologia, contribuiu e defendeu uma abordagem centrada no doente. Este instaurou procedimentos e exames aos fluidos corporais, onde verificou, através da visualização direta de sedimentos e de espumas superficiais (esta última característica também considerada um marcador associada mais tarde à proteinúria) na urina dos doentes, que estes eram indicadores de uma possível doença renal crónica (Dews, 2010; Ferguson & Vaidya, 2010; Ryan *et al.*, 2004).

Um dos grandes marcos na história dos biomarcadores acontece em 1977, onde o termo é referenciado pela primeira vez na área da saúde num artigo científico relativo à oncologia, editado pelo *Journal of the National Cancer Institute* por Karpetsky, Humphrey e Levy que investigaram a possibilidade dos níveis de soro de RNase serem considerados um biomarcador do mieloma (Fathi & Mesbah-namin, 2014; Frank & Hargreaves, 2003; Karley, Gupta, & Tiwari, 2011)

Com o passar dos anos muito se tem descoberto, debatido, analisado e evoluído com o surgimento dos biomarcadores, assim como muitas técnicas analíticas e novas áreas de atuação se têm desenvolvido em torno destes marcadores biológicos, que dia após dia apresentam maior importância no meio científico. Por isso mesmo, na Tabela 1, encontra-se reunido de forma sintetizada os principais acontecimentos históricos sobre a evolução dos biomarcadores.

**Tabela 1.** Principais acontecimentos históricos sobre a evolução dos biomarcadores.

Ano	Acontecimentos Históricos	Referências Bibliográficas
1500 A.C.	<p><b>Egipto:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diagnóstico e prognóstico do estado de saúde das pessoas feito através da observação e análise de amostras biológicas (urina) e da existência de alguns eventos físicos (aumento da temperatura).</li> </ul>	(Ferguson & Vaidya, 2010)
Século VII A.C.	<p><b>Sushruta Samhita:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Descreveu que a urina dos diabéticos era doce devido à atração de formiga a esta amostra, tornando esta característica um marcador para a deteção da diabetes.</li> </ul>	(Dwivedi & Dwivedi, 2007)
Século IV A.C.	<p><b>Hipócrates “Pai da Medicina”:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fundador da área da Urologia;</li> <li>- Defendeu uma abordagem centrada no doente, incluindo procedimentos, observações e exames aos fluidos corporais como forma de diagnóstico;</li> <li>- Verificou a existência de sedimentos e aparecimento de espumas à superfície (esta última característica associada mais tarde à proteinúria) na urina de diversos doentes, indicadores de uma possível doença renal crónica.</li> </ul>	(Ferguson & Vaidya, 2010)
1555	<p><b>Józef Strus (Médico Polaco):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Publicou num livro as primeiras informações acerca de marcadores relativos à pressão arterial.</li> </ul>	(Dews, 2010; Ryan <i>et al.</i> , 2004)
1847	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Primeiro teste de laboratório capaz de detetar biomarcadores de cancro usando uma proteína existente na urina.</li> </ul>	(Jain, 2010)
1901	<p><b>Harvey Cushing (cirurgião americano):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mediu pela primeira vez a pressão arterial de uma forma não invasiva.</li> </ul> <p><b>Willem Einthoven:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inventou a técnica do eletrocardiograma (ECG), conseguindo associar as características desta técnica a diferentes doenças cardíacas.</li> </ul>	(Dews, 2010)

1903	<p><b>Mikhail Tswett:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Desenvolveu pela primeira vez a técnica da cromatografia (líquido-sólido) através do isolamento de pigmentos de plantas.</li> </ul>	(Dews, 2010)
1905	<p><b>Nikolai Korotkoff:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mediu pela primeira vez a pressão diastólica através da distinção do som feito pela contração da artéria, pelo enchimento e esvaziamento da braçadeira de pressão arterial.</li> </ul>	(Dews, 2010)
1928	<p><b>Selmar Aschheim e Bernhard Zondek:</b></p> <p>Isolaram pela primeira vez a hormona Gonadotrofina coriónica humana (HCG) na urina, marcador associado à gravidez.</p>	(Dews, 2010)
1930	<p><b>Tiselius:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Descobriu a técnica de eletroforese para a separação de proteínas. As proteínas existentes na urina são consideradas marcadores de lesão renal;</li> <li>- (Ex: 2- microglobulina).</li> </ul>	(Lock & Bonventre, 2008)
1937	<p><b>Joseph Hamilton:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilizou radioisotopo Sodium-24 criado artificialmente como biomarcador para investigar o metabolismo dos eletrólitos.</li> </ul>	(Dews, 2010)
1941	<p><b>Archer Martin e Richard Syngé:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Desenvolveram a cromatografia líquido-líquido, gasosa e HPLC (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>).</li> </ul>	(Dews, 2010)
1950	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Primeiro teste usando aspartato transferase (AST) como marcador cardíaco.</li> </ul>	(Lock & Bonventre, 2008)
1954	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desenvolveu-se o ensaio para a medição das transaminases no enfarte do miocárdio.</li> </ul>	(Jain, 2010)
1959	<p><b>Roland Gohlke e Fred McLafferty:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Relacionaram finalmente espectrometria de massa e com a cromatografia gasosa o que mais tarde proporcionou o desenvolvimento da espectrometria de massa para moléculas biológicas.</li> </ul>	(Dews, 2010)
1960	<p><b>Cromossoma de Filadélfia:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Investigadores descobriram que o cromossoma 22 encontrava-se encurtado em doentes com leucemia mielóide crónica (LMC). O gene torna-se um biomarcador usado para verificar que doentes eram candidatos a um tratamento específico.</li> </ul> <p><b>Leif Wide e Carl Gemzell</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Desenvolveram com base na imunologia, o teste de inibição da hemaglutinação como um teste de gravidez.</li> </ul>	(Dews, 2010; Sahu <i>et al.</i> , 2011)
1967	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Usaram o soro de Creatina Fosfoquinase como um biomarcador num teste melhorado para enfarte do miocárdio.</li> </ul>	(Jain, 2010)

1971	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aplicaram antígeno Carcinoembrionário (CEA) como biomarcador de cancro.</li> </ul> <p><b>Peter Perlmann e Eva Engvall como também Anton Schuurs e Bauke Van Weemen:</b> Sintetizaram os conhecimentos sobre imunoensaios e desenvolvem a técnica de ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).</p>	(Dews, 2010; Jain, 2010)
1973	<p><b>Joon Rho, A. J. Bauman, Heinz G. Boettger:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Referenciaram pela primeira vez o termo biomarcador num artigo científico, na área da biologia, intitulado “<i>A search for porphyrin biomarkers in nonsuch shale and extraterrestrial samples</i>”.</li> </ul>	(RHO, Bauman, & Boettger, 1973)
1977	<p><b>Karpetsky, Humphrey e Levy:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- O termo biomarcador é mencionado pela primeira vez na área da saúde, nomeadamente em oncologia, num artigo científico intitulado “<i>Influence of renal insufficiency on levels of serum ribonuclease in patients with multiple myeloma</i>”.</li> </ul>	(Dews, 2010; Fathi & Mesbah-namin, 2014; Karley <i>et al.</i> , 2011)
1980	<p><b>Carga viral do HIV:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Usado como biomarcador da progressão da doença e como parâmetro de medição da eficácia do tratamento anti-retroviral.</li> </ul> <p><b>Gene HER-2 e o receptor:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aproveitado como biomarcador de deteção do cancro da mama, devido à sobre expressão do gene em células cancerígenas.</li> </ul>	(Sahu <i>et al.</i> , 2011)
1987	<p><b>Troponina I:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Biomarcador do enfarte do miocárdio.</li> </ul>	(Jain, 2010)
1990	<p><b>Espectrometria de massa acelerada:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Técnica usada para a análise de amostras biológicas para biomarcadores.</li> </ul>	(Jain, 2010)
1995	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aplicação da proteómica para a descoberta de biomarcadores e uso em diagnóstico molecular.</li> </ul>	(Jain, 2010)
1999	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aparecimento da ciência da metabolómica para o estudo de biomarcadores.</li> </ul>	(Jain, 2010)
2000	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A sequenciação do genoma humano é concluída abrindo caminho para a descoberta de biomarcadores de genes.</li> </ul>	(Jain, 2010)
2005	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Descoberta e aplicação de biomarcadores torna-se uma atividade importante na indústria biotecnológica e biofarmacêutica.</li> </ul>	(Jain, 2010)

## 1.2. Definição de Biomarcador

Biomarcadores ou marcadores biológicos, tal como já foi referido anteriormente, não é uma temática recente e tem apresentado uma evolução notória na comunidade científica. Estes marcadores podem apresentar-se sob diversas formas: uma substância, agente químico, células, moléculas, genes, enzimas ou mesmo hormonas que se encontrem presentes no corpo humano (Sahu *et al.*, 2011).

No entanto, para além de se saber como atuam na prática os marcadores biológicos, é necessário elucidar primeiramente em que consistem e como se definem para uma melhor compreensão do conceito.

Assim sendo, segundo o dicionário infopédia da Língua Portuguesa (2015) biomarcador significa “substância que pode ser medida e indica a ocorrência de processos biológicos (normais ou patológicos) ou respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas; marcador biológico”; através do dicionário da *Oxford dictionaries* (2015) obtém-se uma definição semelhante que descreve biomarcador como “*A naturally occurring molecule, gene or characteristic by which a particular pathological or physiological process, disease, etc. can be identified.*”.

Para além da elucidação feita pelos dicionários supramencionados, diversas entidades científicas definiram este termo de forma a melhorar a sua compreensão por toda a comunidade científica, de entre as quais destaca-se:

- Food and Drug Administration (FDA):

*“Biomarkers are measurable characteristics that reflect physiological, pharmacological, or disease processes in animals or humans. Changes in biomarkers following treatment reflect the clinical response to the product. Techniques as disparate as imaging, serum or genetic assays, or psychological tests can yield biomarkers that are useful in product development. Biomarkers can reduce uncertainty by providing quantitative predictions about performance.”*  
(FDA, 2006).

- World Health Organization (WHO):

*“any measurement reflecting an interaction between a biological system and a potential hazard, which may be chemical, physical or biological. The measured*

*response may be functional and physiological, biochemical at the cellular level, or a molecular interaction.*” (World Health Organization, 1993).

- The Biomarkers Definitions Working Group (USA National Institutes of Health):

*“A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention.”*(Atkinson *et al.*, 2001).

Tal como se pôde verifica, existem diversas formas de definir biomarcadores que, de certa forma positivamente entre si. Deste modo, é de salientar que a definição dada pela *Biomarkers Definitions Working Group* tem vindo a destacar-se pela sua utilização frequente na literatura científica como definição *standard* de biomarcador (Strimbu & Tavel, 2011).

### **1.3. Biomarcadores e a sua aplicabilidade**

Os marcadores biológicos incluem parâmetros (químicos, físicos ou biológicos), tecnologias e ferramentas úteis para a compreensão e obtenção de informação acerca das causas, diagnósticos, previsões, monitorização dos estados de progressão e regressão de doenças, como também, resultados sobre tratamentos aplicados em determinadas patologias (Mayeux, 2004; Sahu *et al.*, 2011).

Contudo, para obter a informação sobre qualquer item supramencionado é necessário a utilização de amostras biológicas como meio de pesquisa, isto é, plasma, sangue, saliva, urina, sémen, suor, tecidos ou ar exalado, fluido pleural, peritoneal, amniótico ou mesmo líquido cefalorraquidiano como meio direto de quantificação e identificação de compostos químicos usados como biomarcadores. Porém, também é possível obter essa informação indiretamente, isto é, através da utilização de métodos analíticos e técnicas de imagem (Ex.: verificação de alterações na composição ou função a nível do cérebro) (Amorim, 2003; Fathi & Mesbah-namin, 2014)

Os biomarcadores são uma temática em verdadeira expansão, de tal forma que abrange uma multidisciplinidade de áreas desde a medicina, farmácia, bioquímica, patologia, epidemiologia, toxicologia, biotecnologia e genética, por exemplo (Sahu *et al.*, 2011;

Wilson & Suk, 2002a). O seu desenvolvimento nestes campos de estudos culminou no aparecimento de novas áreas de atuação, tais como, a medicina personalizada, a “*omic’s*” em que engloba o estudo da genómica, proteómica e a metabonomica, as técnicas de espectrometria de massa e técnicas de imagem (incluindo a tomografia por emissão de positrões (TEP), imagem por ressonância magnética (IRM) e tomografia axial computadorizada (TAC)), que tem vindo a valorizar os biomarcadores como importantes indicadores clínicos (Bleavins, Carini, Jurima-Romet, & Rahbari, 2010; Fathi & Mesbah-namin, 2014; Palmer & Barnhart, 2013).

Tendo em conta a diversidade de áreas, os biomarcadores têm bem estipulado quais as suas utilizações, porém, estas podem vir sempre a sofrer alterações e ser adicionadas novas características devido à sua contínua evolução. Assim sendo, os marcadores biológicos, de uma forma geral, podem ser aplicados com o objetivo de ajudarem na deteção/avaliação precoce de doenças e sua prevenção; meio de diagnóstico ou prognóstico de doenças; monitorizarem o progresso e regressão de doenças; utilizado no desenvolvimento de fármacos e testes de diagnóstico; elucidarem a relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco para a saúde; utilizados em ensaios clínicos e medicina personalizada; avaliação de estratégias terapêuticas; servirem como marcadores clínicos de eficácia sobre o tratamento; e como marcadores identificativos sobre a ação de resposta (Amorim, 2003; Atkinson *et al.*, 2001; Hagen, 2012; Palmer & Barnhart, 2013; Sahu *et al.*, 2011).

#### **1.4. Características de um Biomarcador “ideal”**

A aplicabilidade que se encontra associada aos marcadores biológicos nem sempre se encontra reunida e usada na prática toda ao mesmo tempo, isto é, os biomarcadores como podem ser usados para diferentes fins, por vezes apresentam determinadas especificidades que os fazem diferenciar entre si, fazendo com que no momento da escolha do marcador sejam selecionados um invés de outros, de tal modo, que podemos encontrar marcadores que sejam úteis do ponto de vista do diagnóstico ou prognósticos, mas, por outro lado podem não apresentar estas características e ter a capacidade de fornecer informação acerca de uma doença através da monitorização dos marcadores, por exemplo.

Apesar da diversidade de aplicações destes marcadores e as suas múltiplas especificidades, nem todos os compostos químicos podem ser usados como biomarcadores, assim sendo, é necessário que estes apresentem determinadas características e que satisfaçam algumas condições para que possam funcionar como tal.

De forma geral, os biomarcadores devem de ser compostos estáveis, suficientemente sensíveis para serem facilmente quantificáveis, apresentarem especificidade para uma determinada patologia e que tenha a capacidade de identificar subtipos e as suas causas, que seja de aplicação rápida, precisa, seguro, simples e de baixos custos, bem como, inócua para o doente e para a patologia, ou seja, não interfira na doença do indivíduo nem provoque alterações na obtenção de resultados, que apresentem relevância para a deteção da progressão ou regressão de uma doença ou de um tratamento, como também, haja facilidade na sua obtenção sem que seja necessário recorrer a métodos invasivos e os resultados obtidos demonstrem validade em modelos animais/células e em humanos.(Fathi & Mesbah-namin, 2014; Jain, 2010; Vasan, 2006)

Quando se se refere a um biomarcador “ideal”, para além das características supramencionadas, os marcadores devem de ter a capacidade de explicar a ocorrência de determinadas patologias na comunidade, de modo a fornecer informação necessária para seleccionar os melhores candidatos para uma determinada terapêutica e assim ser capaz de detetar precocemente diversas doenças, como também, estes devem de reunir o máximo de qualidades possíveis para que a nível clínico sejam aceites e possam ser aplicáveis (Fathi & Mesbah-namin, 2014)

### **1.5. Biomarcador válido**

Antes de qualquer utilização em prática clínica, e para que os novos marcadores sejam introduzidos no mercado com sucesso, estes são primeiramente sujeitos a diversas etapas de qualificação/eliminação, ou seja, a uma determinada avaliação composta por diversas fases, nomeadamente processos de descoberta, qualificação, verificação/seleção, priorização dos candidatos e, por fim, a mais importante a validação (Frangogiannis, 2012).

Os processos de seleção e validação são essenciais para a introdução no mercado, não só para a obtenção do marcador mais adequado para cada situação, mas também para

que estes garantam as suas características e forneçam os dados válidos necessários para as avaliações pretendidas.

O processo de seleção de um biomarcador consiste num passo importante que antecede a validação do marcador, etapa esta que depende tanto do conhecimento e da informação científica existente sobre o marcador, como dos fatores sociais, económicos ou éticos como condições preponderantes para a seleção (Arango, 2012).

A validação é um processo crucial e essencial para garantir o desenvolvimento de marcadores (S. H. Wilson & Suk, 2002) e, como tal, consiste na avaliação do biomarcador quer a nível das suas características de desempenho, quer na sua relação qualitativa e quantitativa do marcador à exposição, tendo sempre em conta a substância utilizada e o objetivo por ele traçado, como também, a verificação da precisão, amplitude das condições e os dados obtidos por ele (Amorim, 2003; Hunter *et al.*, 2010).

Deste modo, quando se menciona que um biomarcador é válido significa que, após o processo de validação, o marcador apresentou as características necessárias para ser aprovado. De uma forma mais concreta, e segundo a definição descrita na *Guidance for Industry* (2005), um biomarcador válido é “*a biomarker that is measured in an analytical test system with well-established performance characteristics and for which there is an established scientific framework or body of evidence that elucidates the physiologic, toxicologic, pharmacologic, or clinical significance of the test results.*”. Assim, um biomarcador válido na prática deve apresentar um leque de características específicas para que seja aprovado, de entre as quais a precisão, a reprodutibilidade, a especificidade, a confiabilidade, a sensibilidade, custos acessíveis, rentabilidade, ser biologicamente plausível e adequado quer para uso em estudos populacionais, quer para o uso em banco de dados. Estas são as principais premissas para a sua aprovação (Arango, 2012; Decaprio, 1997; Firestein, 2006; S. H. Wilson & Suk, 2002).

Além destas características específicas do marcador, este deve ter em conta outros parâmetros relacionados com a sua validação, ou seja, a identificação e definição do processo biológico a avaliar; ter em conta estudos anteriores relativos à relação entre o agente de exposição, o marcador e o efeito a avaliar; a identificação da variável a quantificar; a seleção dos testes disponíveis para análise; a revisão dos métodos analíticos para a quantificação do marcador atendendo às suas limitações; Padronizar

um protocolo de modo a garantir o nível adequado de controlo e qualidade; a avaliação da variação existente entre a intra e inter-individualidade de uma população; a análise de dados para estabelecer a relação dose-efeito e dose-resposta tendo em conta a suscetibilidade individual; verificar a previsão do risco para a saúde quer para a população em geral quer para subgrupos; e, por fim, a revisão e avaliação de questões éticas e sociais que possam existir (Arango, 2012).

Contudo, para além das características e parâmetros que estão supramencionados e que são necessários cumprir para a sua validação, por vezes surgem algumas desvantagens ou mesmo contratempos que levam a que o marcador não seja de todo aprovado, nem sempre é possível conseguir reunir todos os critérios e condições ideais para a obtenção de um biomarcador válido, devido ao facto da combinação dos requisitos ser muito difícil de alcançar. De forma a remediar este fator ocasionalmente é necessário realizar algumas cedências quer a nível de custos ou mesmo de acessibilidade, de modo a obter dados em tempo útil (Decaprio, 1997). Além disso, caso não hajam dados disponíveis para uma investigação científica pública, por ter sido gerado primeiramente por uma empresa ou não ter sido realizada uma verificação independente dos resultados dos marcadores, ou mesmo se os marcadores, apesar de apresentarem dados que elucidem de forma sugestiva e significativa o seu mecanismo, mas não apresentarem conclusividade, o biomarcador poderá ser rejeitado, não sendo assim validado (Decaprio, 1997; Jain, 2010).

### **1.6. Benefícios e limitações dos Biomarcadores**

Os biomarcadores, para além das suas múltiplas aplicações, apresentam tal como qualquer outro composto, método ou processo, alguns benefícios e limitações relativos ao seu uso.

Os marcadores biológicos dão-nos uma melhor perceção e compreensão dos mecanismos moleculares associados às patologias, sendo também, úteis na descoberta de novas indicações e respostas terapêuticas de fármacos. Além do mais existe uma maior segurança, eficácia e rapidez ao nível do desenvolvimento de fármacos, assim como, uma melhor vigilância pós-comercialização do medicamento (Amir-Aslani & Mangematin, 2010).

A utilização de biomarcadores como métodos rápidos permitiu a sua evolução de tal forma que é possível detetar mais do que um alvo (marcador) nos rastreios (Debnath, Prasad, & Bisen, 2010).

A grande vantagem da utilização em ensaios clínicos dos marcadores biológicos é a sua capacidade de reduzir a duração e os custos associados aos mesmos devido à elevada segurança e eficácia que estes testes apresentam, reduzindo as falhas associadas à fase II do desenvolvimento de fármacos.

Apesar dos inúmeros biomarcadores que vão sendo descobertos, apenas uma pequena percentagem é válida com utilidade clínica (Mayeux, 2004). De quando em quando os marcadores podem apresentar falhas devido a erros de localização, ou seja, não se encontrarem na mesma via fisiopatológica da doença, onde o local de intervenção terapêutica é desconhecido ou não é o mesmo marcador.

Em relação à sua aplicabilidade em ensaios clínicos ao nível do desenvolvimento de fármacos, a farmacodinâmica e a farmacocinética criam expectativas demasiado altas para os resultados obtidos, podendo ocorrer falhas a nível da comunicação entre vários sectores (laboratórios, fabricantes e equipa clínica) relativos aos protocolos aplicados, como também nem todos os marcadores podem ser usados em todas as fases dos ensaios clínicos, ou seja, marcadores usados em fase I não são aplicáveis em fase II (Jain, 2010). Além disso, erros laboratoriais, tempo e locais de armazenamento, assim como os custos associados ao desenvolvimento e análise destes marcadores puderem não ser os ideais, tornam um contratempo. É de salientar ainda que é fundamental ter em conta a responsabilidade que estes marcadores acarretam e os problemas éticos associados à aplicação dos mesmos (Mayeux, 2004).

### **1.7. Considerações éticas e sociais**

Aquando da envolvimento de seres humanos em projetos de investigação, é necessário que esta seja conduzida com integridade e tendo em conta os mais altos padrões éticos. Sendo que a utilização de amostras biológicas humanas e os respetivos dados clínicos tem vindo a aumentar consideravelmente por parte de investigadores e instituições de pesquisa, questões éticas e sociais têm vindo a surgir (Budimir *et al.*, 2011; INCHEM, s.d.).

A utilização de biomarcadores para efeitos de investigação levam sempre ao surgimento de determinadas questões, quer a nível de fatores pessoais, quer a nível de fatores científicos, que vão limitar o desenvolvimento da pesquisa devido a ideais, atitudes, crenças, origens étnicas e práticas culturais dos indivíduos participantes. É de salientar que os dadores envolventes no projeto são indivíduos voluntários e as suas amostras são proibidas de serem vendidas. O processo de investigação tem ainda em consideração o respeito pela dignidade, o direito e a liberdade de escolha do dador, podendo, por exemplo, a qualquer momento da pesquisa terminar a sua participação (INCHEM, s.d.; Shankar & Uday, 2011).

Considerações relativas a quem ou como devem ser fornecidos os resultados da pesquisa e a respetiva interpretação, a existência ou não da proteção de dados para com o doente, assim como, o tipo de consentimento informado a aplicar, são questões que vão depender das práticas vigentes de cada país. No caso específico de Portugal, é necessário uma autorização por parte da Comissão Nacional de Proteção de Dados, como também, a existência de um consentimento informado por escrito (este consentimento tem alguma flexibilidade legislativa no que diz respeito à ausência de normas formais impostas por lei comparativamente com os quatro modelos base existentes: consentimento amplo, restrito, por camadas e específico) para obter e utilizar material biológico para fins investigação (Diário da República, 2005; INCHEM, s.d.; Salvaterra *et al.*, 2008).

### **1.8. Classificação de Biomarcadores**

Os biomarcadores, segundo diversos autores, podem ser classificados de variadas formas, diferindo essencialmente quanto à sua aplicabilidade e finalidade. Assim sendo, segundo a FDA (2006), os biomarcadores podem ser classificados em quatro formas: biomarcadores de prognóstico: com a finalidade de determinar a progressão de uma patologia no doente; biomarcadores preditivos: indicam a probabilidade de resposta do doente a um tratamento específico; biomarcadores farmacodinâmicos: demonstram a capacidade de resposta biológica do doente após toma de um fármaco específico; biomarcadores substitutos: usados como um substituto para um ponto de vista de eficácia clínica (Fathi & Mesbah-namin, 2014; Hagen, 2012).

Os marcadores biológicos podem ainda apresentar outras características específicas e serem usados como biomarcadores de imagem, capazes de auxiliar na detecção e tratamento precoce de doenças através da sua utilização em tecnologias de imagem como a TAC, TEP e IRM (Fathi & Mesbah-namin, 2014; Sahu *et al.*, 2011).

Outra forma possível de classificação assenta em métodos de biologia molecular e genética e, segundo Sahu *et al.* (2011), engloba três tipos de marcadores: Tipo 0 ou marcadores de história natural: são marcadores da história natural da doença e indicadores da sua gravidade, refletem os mecanismos patogénicos e correlacionam longitudinalmente os resultados clínicos, independentemente do tratamento aplicado; Tipo 1 ou marcadores da atividade farmacológica: é um marcador capaz de capturar o efeito de uma intervenção terapêutica tendo em conta o seu mecanismo de ação; Tipo 2 ou marcador substituto: é considerado como um parâmetro de substituição, uma vez que este tem a capacidade de prever através da sua substituição benefícios clínicos (Fathi & Mesbah-namin, 2014; Frank & Hargreaves, 2003).

Além das classificações acima mencionadas, existe ainda uma outra classificação mais comumente usada e a que será considerada e adotada nesta monografia.

Assim sendo, a última forma de classificação dos marcadores biológicos tem em conta três categorias, biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de suscetibilidade.

No que concerne aos biomarcadores de exposição, estes podem ser subdivididos em dois tipos de marcadores, biomarcadores de dose interna (que indicam a situação e a extensão da exposição ao organismo) e biomarcadores de dose eficaz (a exposição a um composto específico conduz a esse composto ou o seu metabolito a alcançar um alvo significativamente tóxico) (Ali & Naaz, 2013; Timbrell, 1998).

Os marcadores de exposição caracterizam-se essencialmente por avaliarem e confirmarem a presença de substâncias exógenas, metabolitos ou produtos resultantes da interação entre xenobióticos e determinados alvos moleculares ou celulares que tenham entrado em contacto com o organismo, refletindo assim a biodisponibilidade perante presença de determinadas substâncias (Ali & Naaz, 2013; Arango, 2012; Silbergeld *et al.*, s.d.).

No que diz respeito aos biomarcadores de efeito, estes marcadores podem ser igualmente designados de marcadores biológicos de doença, resposta ou funcionais, e apresentam na sua constituição diversas subcategorias, de entre as quais se destaca o grupo dos biomarcadores de *stress* oxidativo, pelo fato de ser o tema central deste trabalho e que será abordado e desenvolvido mais a frente nesta monografia. Além deste marcador biológico, os biomarcadores de efeito englobam também os biomarcadores de função enzimática, biomarcadores de função imunológica, biomarcadores de saúde óssea e os biomarcadores de renovação celular (Gulumian *et al.*, 2006; Timbrell, 1998).

Os biomarcadores de efeito consistem não só numa avaliação da alteração bioquímica, genética, fisiológica ou comportamental existente dentro do organismo que pode conduzir à associação com uma doença, mas também pode ser considerado como um indicador de anomalias ou um parâmetro biológico mensurável, capaz de medir quantitativamente e qualitativamente a alteração ocorrida no organismo, refletindo por exemplo a interação entre uma substância química e os recetores biológicos. Estes biomarcadores são utilizados essencialmente para apoiar o prognóstico e diagnóstico clínico, com o objetivo de identificar eventos precoces e reversíveis, e prever o desenvolvimento de uma doença ou mesmo indicar a sua pré-existência (Ali & Naaz, 2013; Amorim, 2003; Arango, 2012; Decaprio, 1997).

Por fim, os biomarcadores de suscetibilidade elucidam-nos acerca da influência que os fatores hereditários e os fatores adquiridos (por meio de alterações fisiológicas ou ambientais, medicamentos ou doenças) têm na suscetibilidade de cada indivíduo, sendo depois essa suscetibilidade refletida na capacidade de resposta que cada um consegue demonstrar quando está exposto a uma determinada substância exógena. Assim sendo, estes marcadores vão demonstrar porque certas pessoas são mais sensíveis a determinadas substâncias do que outras (Ali & Naaz, 2013; Amorim, 2003; Arango, 2012; Costa, 1996).

## CAPÍTULO 2 - BIOMARCADORES DE *STRESS* OXIDATIVO

### 2.1. Definição de Biomarcadores de *Stress* Oxidativo

Os biomarcadores de *stress* oxidativo é um grupo de marcadores biológicos que se encontram inseridos nos biomarcadores de efeito (biomarcadores estes já descritos anteriormente). Estes marcadores de *stress* oxidativo são utilizados como indicadores para a deteção de processos biológicos normais, relativos a doenças ou indicadores sobre a resposta farmacológica para intervenção terapêutica (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Os marcadores biológicos são essencialmente moléculas mesuráveis, sensíveis, específicas e estáveis, capazes de medir não só as ações dos radicais livres, nomeadamente das espécies reativas de oxigénio (ROS), como também as moléculas do sistema antioxidante, que por aumento do *stress* oxidativo levam à sua alteração.

Os biomarcadores de *stress* oxidativo englobam três tipos de moléculas, lípidos, proteínas e DNA, que por ação das ROS conduzem a reações de oxidação sobre estas moléculas, modificando-as e contribuindo para o desenvolvimento da patogénese e progressão de diversas doenças. Deste modo, a existência de marcadores oxidativos capazes de medir, avaliar e elucidar acerca dos mecanismos e implicações biológicas associadas ao dano oxidativo, é crucial para que seja possível planear ações eficazes para o controlo e prevenção da ROS (K. B. F. Barbosa *et al.*, 2008; Ho, Galougahi, Liu, Bhindi, & Figtree, 2013; Jain, 2010). Para isso acontecer, é necessário que os biomarcadores *stress* oxidativos apresentem características e requisitos adequados para a sua aplicabilidade, isto é, que sejam quimicamente estáveis e específicos para as espécies reativas oxigénio, que estes participem na iniciação e progressão de doenças de forma inócua. Nos ensaios, os métodos de quantificação analítica a usar devem de ser exatos, precisos, específicos, validados e livres de interferências, de modo a que possam ser estabelecidos intervalos e valores de referência consensuais. A existência de concentrações minimamente mensuráveis quer de ROS quer de biomarcador é crucial para que seja possível realizar estudos *in vitro* e *in vivo* (Giustarini & Dalle-donne, 2009).

## 2.2. Stress oxidativo

O Homem desde sempre tem vindo a ser exposto e sujeito à ação de diversos fatores, nomeadamente, ambientais, biológicos e químicos, que de alguma forma têm tido influência direta na sua saúde (Rahal *et al.*, 2014). A ocorrência de desequilíbrios, degradação celular, doenças e o desenvolvimento de processos de envelhecimento são muitas vezes desencadeados por questões de *stress* oxidativo (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

Assim sendo, o processo de *stress* oxidativo consiste numa perturbação do equilíbrio fisiológico existente entre o sistema oxidante e antioxidante, onde a ação oxidante se encontra favorecida, conduzindo assim à ocorrência de um potencial dano celular (Figura 1) (Kiriaque Barra Ferreira Barbosa *et al.*, 2008; Blumberg, 2004; Niki & Yoshida, 2005; Poljsak, Šuput, & Milisav, 2013).

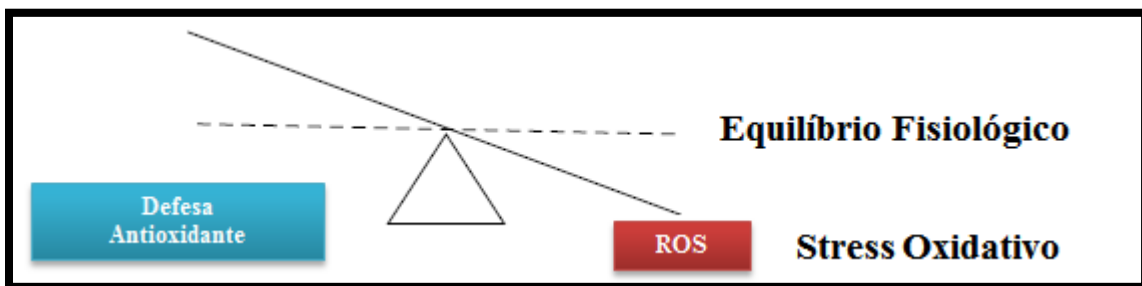


Figura 1. Esquema representativo do *stress* oxidativo. Demonstração do desequilíbrio fisiológico entre o sistema oxidativo e antioxidante provocado pela produção excessiva de espécie reativas de oxigénio (ROS) (adaptado de Poljsak *et al.*, 2013).

Neste processo o desequilíbrio gerado deve-se essencialmente à produção de uma grande quantidade de radicais livres contendo oxigénio, que são geralmente denominados por espécies reativas de oxigénio (ROS). Estas espécies reativas são formadas com base numa reação em cadeia despoletada por diversos fatores (radiações ultravioletas e altas temperaturas) que, na presença de superóxidos, levam à consequente formação de radicais livres, nomeadamente, o radical ião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroperóxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogénio (apesar de não ser um radical é considerada uma espécie reativa de oxigénio), radical óxido ( $O^{\bullet-}$ ) e, por fim, radical

hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) (Figura 2) (Kooter, 2004; Pruchniak, Arazna, & Demkow, 2015; Rahal *et al.*, 2014).

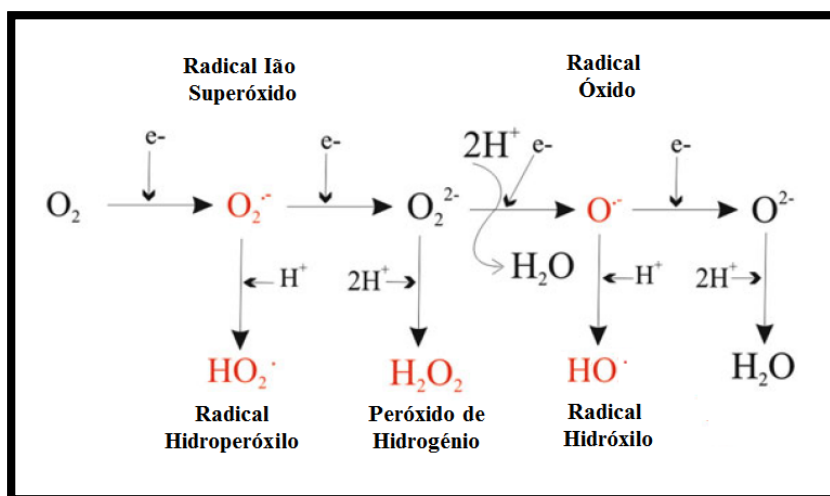


Figura 2. Representação esquemática da formação de radicais livres (adaptado de Pruchniak *et al.*, 2015).

A elevada produção das ROS, pode ter por base fontes exógenas e endógenas. Relativamente às fontes exógenas, podemos destacar os produtos químicos, tabaco, alimentos, poluentes, ozono, metais pesados, radiações e agentes infecciosos (bactérias e vírus). Quanto às fontes endógenas, estas podem ocorrer por ação mitocondrial (através de processos de fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons), peroxissomal e pelo retículo endoplasmático. Além destas fontes endógenas, a atividade enzimática, embora seja em menor escala, a xantina oxidase (XO), NADPH oxidase e do citocromo P450 podem contribuir para a produção das ROS (Al-Dalaen & Al-Qtaitat, 2014; Ho *et al.*, 2013; Rahal *et al.*, 2014; Siwek *et al.*, 2013; Thanan, Oikawa, Hiraku, Ohnishi, & Ma, 2015).

De modo a que a sobrevivência e o equilíbrio fisiológico do organismo se mantenha, é crucial a existência de agentes defensivos capazes de proteger do ataque de espécies reativas de oxigênio, ação essa conferida por dois grupos de antioxidantes importantes, os enzimáticos e os não-enzimáticos (Tabela 2) (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010).

Contudo, quando a taxa de produção das ROS são maiores comparativamente à taxa de eliminação, os antioxidantes não conseguem responder eficazmente levando à ocorrência de um desequilíbrio do meio, e, desse modo, desencadear potenciais danos

celulares a nível dos lípidos, proteínas e DNA, comprometendo assim a saúde, a viabilidade e a resposta celular, que, por conseguinte, conduzirão à apoptose (Barbosa, Costa, Paula, Minim, & Bressan, 2010; Dalle-Donne *et al.*, 2006; Ogino & Wang, 2007; Siwek *et al.*, 2013).

As ROS em concentrações relativamente baixas, vão desempenhar funções benéficas para com o organismo, quer a nível da regulação da homeostase e do desempenho da resposta imunológica, na ação de diversas atividades celulares (ex: mitose) (Kooter, 2004; Siwek *et al.*, 2013). Porém, as ROS quando se encontram em concentrações maiores tornam-se instáveis, muito reativas e apresentam uma semivida muito curta. Desse modo, a deteção destas espécies reativas em amostras biológicas, como tecidos, fluídos e sistemas biológicos complexos, torna-se uma tarefa muito difícil de realizar, ou mesmo quase impossível, devido às características que lhe estão associadas, e, como tal não há possibilidade medir diretamente as ROS (Ogino & Wang, 2007; Siwek *et al.*, 2013).

Tabela 2. Identificação de Antioxidantes Enzimáticos e Não-Enzimáticos (adaptado de Lobo *et al.*, 2010).

Antioxidantes		
Enzimáticos	Não-Enzimáticos	
Superóxido Dismutase (SOD)	Vitamina E (α-Tocoferol)	Coenzima Q10 (Ubiquinona)
Catalase (CAT)	Vitamina C (Ácido Ascórbico)	Bilirrubina
Sistema de Glutationas (Glutationa; Glutationa Peroxidase; Glutationa redutase; Glutationa S-transferase)	Vitamina A (Retinol)	Grupo Tiol (Glutationa; Tioredoxina)
	Carotenóides (β-caroteno)	Polifenóis (Flavonoides)
	Melantonina	Ácido Úrico

Visto a dificuldade para se obter informações acerca da ação e meios envolventes pela ROS, é necessário encontrar outras alternativas para se conseguir detetar e localizar esta

espécie. Como tal, a opção encontrada para a medição da ROS passa pela utilização de uma espécie com características estáveis, detetáveis e mensuráveis, capazes de refletir as vias que levam ao desencadeamento de determinadas patologias (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

Assim sendo, os produtos celulares resultantes do dano oxidativo são os lípidos, as proteínas e o DNA, que reúnem as características necessárias para serem utilizados como biomarcadores de *stress* oxidativo, marcadores biológicos estes capazes de detetar indiretamente a ação das ROS (Ogino & Wang, 2007).

## **2.3. Efeito do *Stress* Oxidativo em Lípidos, Proteínas e DNA**

### **2.3.1. Lípidos: Peroxidação Lipídica**

De forma a proporcionar o crescimento e manutenção dos organismos vivos, bem como o bom funcionamento celular e estrutural das mesmas, é crucial a existência de determinadas macromoléculas, nomeadamente os lípidos. Estes compostos encontram-se subdivididos e organizados por diferentes classes lipídicas, apresentando diversidade quer em termos de estrutura química função biológica. Os lípidos são compostos orgânicos que apresentam vasto leque de funções essenciais para o corpo humano, nomeadamente a capacidade de atuar como armazenador de energia, como componente essencial das estruturas das membranas (bicamada fosfolipídica), envolvido na biossíntese de algumas substâncias cruciais no organismo (prostaglandinas), como também cofator de enzimas (Dąbrowska, Zielińska, & Nowak, 2015; Santos-Fandila, Camino-Sánchez, & Zafra-Gómez, 2014; Yin, Xu, & Porter, 2011).

Os lípidos, principalmente os glicolípidos, fosfolípidos e o colesterol, são os principais alvos de ataque das ROS (Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014). Este ataque vai provocar a oxidação dos lípidos levando à ocorrência de um processo complexo denominado de peroxidação lipídica (LPO) (Yin *et al.*, 2011). A ação da peroxidação lipídica provoca um impacto negativo no organismo, desencadeando diversos danos celulares que posteriormente vão culminar em múltiplas patologias e condições clínicas.

Algumas das alterações que a LPO despoleta recaem essencialmente a nível do funcionamento das membranas celulares e a sua permeabilidade e fluidez (encontra-se

diminuída). A inativação de enzimas e recetores, a perda de seletividade por troca iónica, a libertação não programada, os danos ao DNA e proteínas, bem como, perda de função de barreira e formação de produtos tóxicos, são mais alguns dos danos que este processo induz.

Todas estas alterações provocadas pela LPO vão comprometer o bom funcionamento de diversos organelos, nomeadamente as mitocôndrias, o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático e lisossomas. O fígado, coração, rins, pulmões e cérebro são os órgãos mais são afetados por este processo. O surgimento de diversas patologias é de esperar tendo em conta todas as alterações ocorridas por este mecanismo, de onde se podem destacar as doenças neurodegenerativas (*Parkinson* e *Alzheimer*), doenças cardiovasculares (aterosclerose), doenças respiratórias e metabólicas, diabetes, mecanismos de envelhecimento e cancro (Aruoma, 1998; Cotinguiba *et al.*, 2013; Dalle-Donne *et al.*, 2006; Devasagayam, Boloor, & Ramasarma, 2003; El-Bahr, 2013; Santos-Fandila *et al.*, 2014; Thanan *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2011).

A peroxidação lipídica consiste essencialmente num processo de oxidação de lípidos, designadamente de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (exemplos de PUFA's: ácido araquidónico e ácido linoleico) existentes maioritariamente na membrana celular, que por via não-enzimática vão sofrer o ataque por parte de alguns radicais livres e de metais de transição, provocando degradação oxidativa. O mecanismo inerente à peroxidação lipídica assenta num processo que engloba três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 3) (Ayala *et al.*, 2014; Frijhoff *et al.*, 2015; Thanan *et al.*, 2015).

A primeira etapa da peroxidação lipídica, denominada de iniciação, consiste no ataque de radicais livres, nomeadamente do radical hidróxilo (HO•; espécie mais reativa dentro dos radicais livres), a um ácido gordo polinsaturado (LH), provocando a dissociação do átomo de hidrogénio do grupo metileno existente no lípido, formando um radical alquilo (L•). O radical alquilo formado é de certo modo instável e de forma a tornar-se mais estável este utiliza mecanismos de ressonância, que ao se reestruturar e estabilizar, forma um radical dieno conjugado (L•) (Dąbrowska *et al.*, 2015; Frijhoff *et al.*, 2015; Min & Ahn, 2005; Santos-Fandila *et al.*, 2014).

A propagação, fase seguinte, consiste na reação do radical dieno conjugado (L•) com uma molécula de oxigénio existente no meio, que por interação formam um radical

peróxilo (LOO•). Este radical tem a capacidade de reagir com outro PUFA vizinho não oxidado (LH), capturando-lhe o átomo de hidrogénio que necessita, e assim produzir dois produtos primários, um lipohidroperóxido (LOOH) e um radical alquilo (L•) (Dąbrowska *et al.*, 2015; Frijhoff *et al.*, 2015; Min & Ahn, 2005).

Com os produtos primários obtidos, o processo de peroxidação lipídica pode desencadear-se por duas vias: 1) reinicia-se a fase de propagação, quer através do uso do radical dieno conjugado (L•) onde todo o processo anteriormente descrito é novamente realizado (a), quer através do uso do lipohidroperóxido (LOOH), que na presença de metais de transição ( $Fe^{3+}$  e  $Fe^{2+}$ ) no meio vão interagir e originar radicais peróxilo (LOO•), que é utilizado também na etapa de propagação (b), dando assim origem a uma contínua e cíclica reação de oxidação lipídica; ou 2) prosseguir para a fase de terminação (c) (Dąbrowska *et al.*, 2015; Frijhoff *et al.*, 2015; Min & Ahn, 2005; Santos-Fandila *et al.*, 2014).

Relativamente à fase de terminação esta etapa pode ocorrer de diversas formas: 1) formação de um produto não-radicalar, obtido através da reação entre dois radicais (A); 2) formação de um produto não-radicalar, obtido através da ação de antioxidantes (Ex: tocoferol) com radicais lipídicos (LOO•) (B); 3) produção de produtos secundários, nomeadamente, 4-hidroxinonal (HNE), Malondialdeído (MDA), Acroleína (ACR) e Isoprostanos, que são obtidos através da degradação, decomposição e ciclização de LOO• (C) e utilizados como potenciais marcadores de *stress* oxidativo (Dąbrowska *et al.*, 2015; Frijhoff *et al.*, 2015; Min & Ahn, 2005; Santos-Fandila *et al.*, 2014; Stanicka, Landry, & Cotter, 2015).

Os produtos da peroxidação lipídica podem ser medidos através de diversos tipos de amostras biológicas, designadamente, sangue, eritrócitos, plasma, urina, saliva, lagrimas, bÍlis, fluidos do líquido cefalorraquidiano e sinovial, suor e de tecidos, sendo que a sua extração em alguns dos casos mais invasivos que outros. Estas amostras biológicas são posteriormente submetidas a análise por variados métodos, desde espectrofotometria de massa (MS), HPLC, fluorescência (FL), quimioluminescência (CL), cromatografia gasosa ou líquida, métodos de ELISA, radioimunoensaaios (RIA), imunoensaaios enzimáticos (EIA), entre outros, que consoante o produto LPO a analisar serão atribuídas as técnicas analíticas mais adequadas e específicas para cada um (Bhattacharjee, 2014; Devasagayam *et al.*, 2003; Niki, 2014).

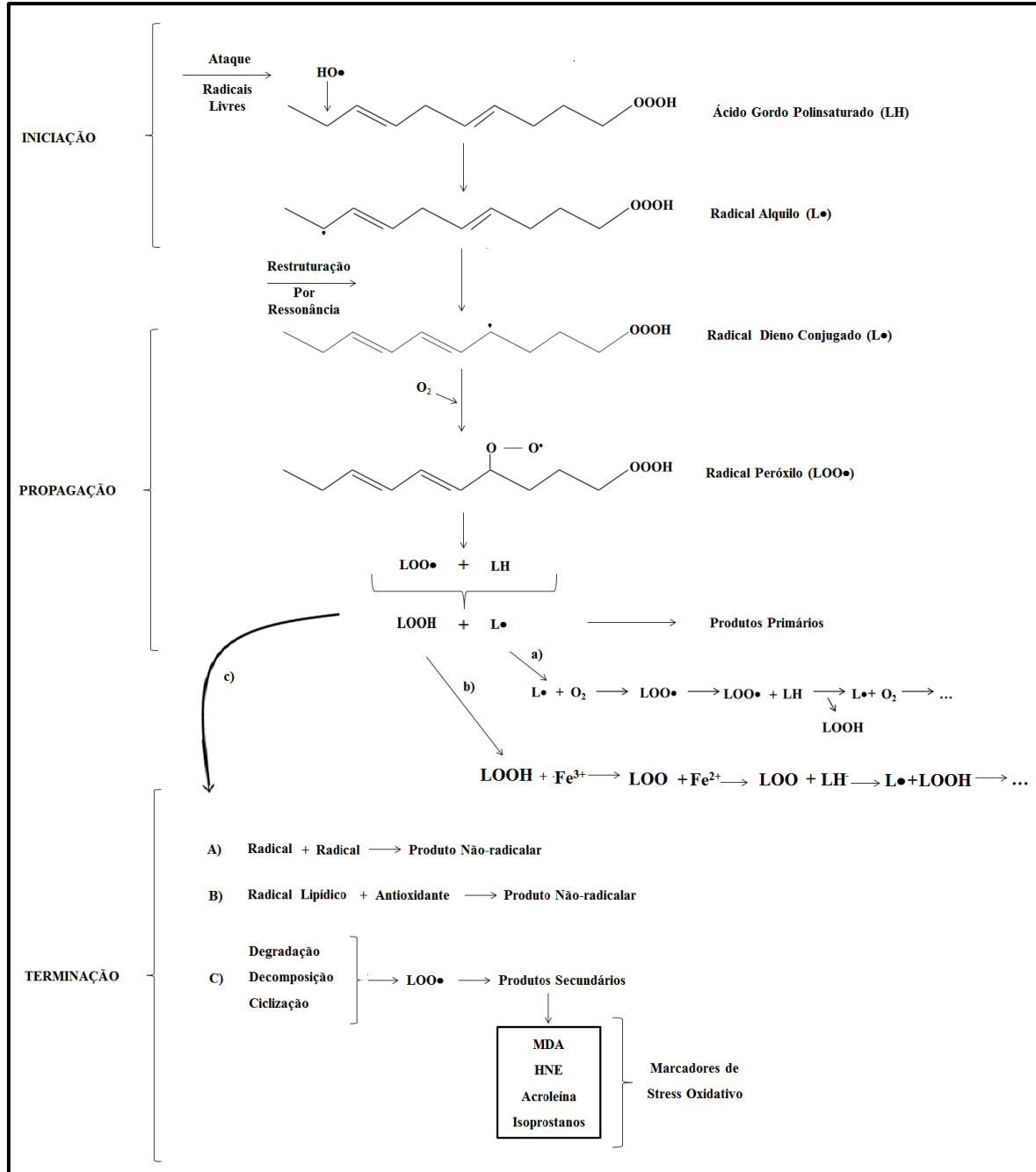


Figura 3. Esquema representativo do processo de peroxidação lipídica. a) via de reiniciação da fase de propagação utilizando o radical dieno conjugado( $\text{L}\bullet$ ); b) via de reiniciação da fase de propagação utilizando lipohidroperóxido ( $\text{LOOH}$ ) e metais de transição ( $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ); c) via usada para proceder à fase de terminação; A, B, C) Três formas de proceder à terminação do processo de peroxidação lipídica (adaptado de Lushchak & Semchyshyn, 2012).

Contudo, apesar do grande leque de métodos sofisticados já existentes para executar as medições e respectivas quantificações de biomarcadores, até à data ainda não foi desenvolvido uma técnica que reúna todas as requisições e especificações necessárias para o método analítico ideal, ou seja, que apresentasse no seu conjunto precisão, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, fácil e rápido manuseio, de baixos custos e pouco demorado. De modo a contornar a lacuna dos métodos analíticos, os investigadores utilizam as técnicas disponíveis e adaptam-nas tendo em conta o tipo de biomarcador, amostra ou objetivo de estudo. Além disso, a medição de produtos da LPO nem sempre é fácil, uma vez que são formadas imensas moléculas *in vivo*, tornando difícil sua quantificação e identificação. Fatores como os baixos níveis de produtos da peroxidação lipídica nas amostras biológicas ou mesmo a interferência da oxidação durante o processamento, armazenamento, análise ou mesmo ação de outros materiais biológicos podem condicionar a sua medição (Niki, 2014).

### **2.3.1.1. Biomarcadores da Peroxidação Lipídica**

#### **I. 4-Hidroxinonenal**

O marcador da peroxidação lipídica, 4-hidroxinonenal ou 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal (HNE), foi mencionado pela primeira vez em 1980 por Benedetti, Comporti e Esterbauer num artigo científico, intitulado de *"Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids"*. É através deste trabalho, onde foi estudada a ação do NADPH-Fe na indução da peroxidação de lípidos microssomias do fígado, que se toma conhecimento sobre a formação de HNE num sistema biológico. É também através deste estudo que este é identificado como sendo uma molécula intermediária e considerado a maior substância citotóxica quando ocorre a inibição da glucose-6-fosfatase (Benedetti, Comporti, & Esterbauer, 1980). Já em 1991, com o artigo de Esterbauer, Schaur e Zollner, *"Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes"*, que o HNE é descrito e mencionado de forma detalhada as características químicas e bioquímicas deste composto ao mundo científico (Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991).

O 4-Hidroxinonenal é um produto secundário da peroxidação lipídica de ácidos gordos polinsaturados, conhecido por ser um hidroxiálquenal, ou mesmo um hidroxiáldeído, e é classificado como um aldeído  $\alpha,\beta$ -insaturado (Csala *et al.*, 2015). Esta molécula apresenta uma fórmula molecular de  $C_9H_{16}O_2$ , correspondendo a um peso molecular de 156.225 g/mol (Pubchem, s.d.). O HNE, sendo um aldeído de cadeia longa, apresenta na sua totalidade 9 carbonos, integrando na sua estrutura 3 grupos funcionais: um grupo aldeído (encontrando-se na extremidade da cadeia, no carbono 1), um grupo alceno (representado pela ligação dupla entre os átomos de carbono 2 e 3) e, por fim, um grupo hidroxilo (que se encontra ligado ao carbono 4 da cadeia) (Figura 4) (Ayala *et al.*, 2014; Csala *et al.*, 2015; Schwarzer, Arese, & Skorokhod, 2015).

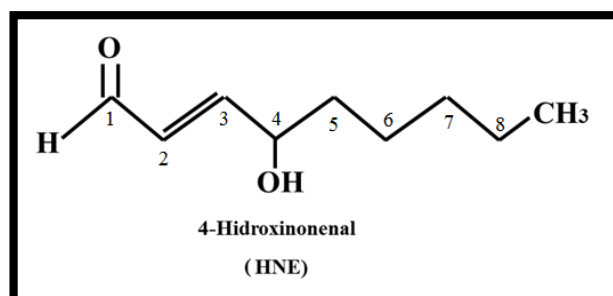


Figura 4. Fórmula Estrutural do 4-Hidroxinonenal (adaptado de Schwarzer *et al.*, 2015).

Os aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, são considerados compostos altamente reativos e, no caso do HNE, a sua reatividade deve-se principalmente aos três grupos funcionais que o constituem: os carbonos da ligação dupla vão torná-lo altamente eletrofílico, o carbono do grupo aldeído é um centro oxidação-redução e, além disso, os três grupos funcionais por si só vão influenciar o carbono 3 do HNE, o que o torna suscetível ao ataque nucleófilo devido à sua eletropositividade, proporcionando futuramente a formação de adutos. O HNE, além de todas as ações supracitadas, ainda apresenta na sua molécula características hidrofílicas (devido ao grupo aldeído) e hidrofóbicas (entre os carbonos 5 a 9), que vão conferir um enriquecimento preferencial por estruturas ricas em lípidos, ou seja, por membranas. Este enriquecimento vai conferir a capacidade de este atravessar membranas celulares, interferindo na fluidez destas estruturas, bem como na assimetria dos fosfolípidos. E, uma vez que HNE tem a capacidade de atravessar membranas, este vai-se encontrar não só em meio intracelular mas também em meio extracelular, devido

à sua afinidade (Guéraud *et al.*, 2010; Pizzimenti, Ciamporcero, Daga, Pettazzoni, & Arcaro, 2013; Schwarzer *et al.*, 2015).

No que consiste às suas características, o 4-hidroxinonenal é considerado um indicador indireto do *stress* oxidativo, sendo possível medi-lo em amostras biológicas de plasma, urina e fezes (Erzsébet, Dumitru, Ibolya, & Daniela-lucia, 2015). Além do mais, esta molécula apresenta um tempo de semi-vida curto (menos de 2 min)(Breitzig, Bhimineni, Lockey, & Kolliputi, 2016), é altamente reativa na presença com fosfolípidos, péptidos, proteínas, DNA e compostos de grupos nucleofílicos de tiol ou amina. É um composto polar e quimicamente estável mas, em elevadas concentrações, é considerada altamente tóxica, sendo essencialmente citotóxico, genotóxico, mutagénico (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Halder & Bhattacharyya, 2014; Shoeb, Ansari, Srivastava, & Ramana, 2015; Spickett, 2013). O HNE em condições fisiológicas normais apresenta uma concentração entre 0.1 - 3µM, mas quando se encontra sob ação de *stress* oxidativo este valor aumenta para valores entre 10µM – 5mM (Chen, Niki, & Vella, 2006). Esta molécula, em condições não tóxicas, é considerada uma molécula de sinalização eficiente e a sua ação consiste na modificação da transdução de sinal, que regula a síntese de novas enzimas desintoxicantes, na proliferação celular, atua sobre a apoptose e regulação do ciclo celular, na diferenciação e resposta inflamatória e também na expressão da adesão celular e no *turnover* de proteínas (Schwarzer *et al.*, 2015). Contudo, quando há o aumento das concentrações de HNE devido a efeitos de *stress* oxidativo este pode provocar inativação de várias enzimas, inibindo a síntese de proteínas e DNA, estimulação da fosfolipase C, redução da comunicação das *gap-junction*, estimulação da quimiotaxia de neutrófilos, modulação da agregação plaquetar e de vários genes (Dalle-Donne *et al.*, 2006), sendo que a ocorrência destas alterações biomoleculares vão culminar no aparecimento de efeitos fisiológicos e patológicos indesejados, dentro dos quais podemos destacar, doenças metabólicas, doenças cardíacas, doença de *Alzheimer*, doença de *Parkinson*, doença de *Huntington*, malária, doença vascular periférica, esclerose múltipla, aterosclerose, osteoporose, cancro e doenças inflamatórias (Shoeb *et al.*, 2015).

Após a decomposição dos lípidos hidroperóxidos onde há a formação do 4-hidroxinonenal, esta molécula pode sofrer biotransformação. A biotransformação é uma via de ação rápida (sendo que a sua metabolização demora cerca de 3-5 min) e eficiente.

Consiste no desenvolvimento de mecanismos de defesa e de proteção para as células por parte das mitocôndrias contra a acumulação e toxicidade do HNE, provocando uma desintoxicação desta molécula, tornando-a menos reativa, evitando a ocorrência de eventos indesejados (Guéraud *et al.*, 2010). A desintoxicação do 4-hidroxinonal pode ocorrer por duas vias, enzimática ou não-enzimática. A via enzimática consiste num processo bem regulado e explicado a nível da desintoxicação do HNE, onde o corpo humano consegue com a presença de controladores naturais da molécula, inibir a ação do 4-hidroxinonal ou mesmo controlar as concentrações intercelulares da mesma através de reações metabólicas de fase I (ocorrendo reações de oxidação-redução com diversas moléculas, como por exemplo, a aldo-ceto redutase (AKR) ou o álcool desidrogenase (ADH) reduzem o HNE a 1,4-dihidroxi-2-noneno (DHN) e o aldeído desidrogenase (ALDH) por oxidação do HNE obtém o ácido 4-hidroxi-2-nonanóico (HNA)) e fase II (onde há conjugação com a glutathiona (GSH) que reage com HNE espontaneamente, ou com a glutathiona-S-transferase (GST) que catalisa o HNE formando o aduto GST-HNE) (Csala *et al.*, 2015; Mol *et al.*, 2017; Zhong & Yin, 2015).

Por outro lado, se a desintoxicação for realizada através da via não-enzimática, esta levará a formação de adutos onde se vai envolver essencialmente em reações químicas com proteínas, DNA, aminofosfolípidos e outras moléculas mais pequenas, que pode influenciar processos biológicos, quer conferindo ações de proteção quer provocando dano, consoante o aduto formado. Esta via por norma recorrer a dois tipos de processos para a formação de adutos, por adição de Michael (onde se formam adutos estáveis, o HNE vai reagir com resíduos de lisina, cisteína e histidina sendo estes os principais alvos), como também, através de base de Schiff (sendo um processo lento e reversíveis, onde HNE pode reagir com lípidos contendo grupos amina, como por exemplo: fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingosina). Estas vias são importantes para a desintoxicação de HNE, sendo que a via enzimática até ao momento é a mais desenvolvida, com ajuda de vários métodos analíticos, permitiu a identificação, caracterização e quantificação de uma forma mais esclarecedora das diversas rotas existentes, sendo ainda necessário realizar mais estudos para perceber melhor o metabolismo em diferentes condições fisiológicas. Quanto à via não-enzimática, sendo um processo bastante seletivo e complexo dependente de vários fatores, é um processo que ainda necessita de vários estudos essencialmente para se entender os efeitos

biológicos que os adutos provocam, como também, perceber o seu mecanismo (Csala *et al.*, 2015; Halder & Bhattacharyya, 2014; Mol *et al.*, 2017).

No que concerne aos métodos existentes para deteção e quantificação do HNE, e tendo em conta a sua reatividade, este pode ser medido quanto à sua forma livre ou acoplado como adutos (HNE-proteína). O HNE na forma livre, pode ser analisado através de métodos de HPLC e de espectrofotometria, onde apresenta uma absorvância que abrange um intervalo UV entre 220-223 nm (Spickett, 2013). A utilização de aldeídos reativos em amostras biológicas é forma de se obter uma deteção mais específica e sensível a esta molécula, sendo possível usar como reagente o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e o 1,3-ciclohexanodiona (CHD). A derivatização utilizando o reagente de DNPH é um método que por vezes consome muito tempo uma vez que até à deteção ainda passa pela cromatografia de camada fina (TLC) e HPLC, sendo que usando o reagente CHD este forma um derivado detetável por fluorescência, sendo uma solução mais rápida. Além dos métodos supramencionados ainda é possível usar espectrometria de massa (MS), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). No método de GC-MS este requer também uma derivatização da amostra como por exemplo com, pentafluorbenzil-hidroxilamina (PFBHA) que forma um derivado denominado de pentafluorbenziloxima (PFBO) sendo detetado através de ionização química negativa utilizando um padrão interno (HNE deuterado) como forma de comparação. Quanto ao método de LC-MS este não requer uma derivatização da amostra, uma vez que a amostra é analisada com mínima manipulação. Contudo, os métodos para a deteção e análise de HNE é de certa forma limitada devido à reatividade existente nesta molécula, através da formação de adutos com DNA, proteínas e aminofosfolípidos (França *et al.*, 2013; Mol *et al.*, 2017; Spickett, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2007).

Quanto aos métodos para deteção de HNE com adutos, estes baseiam-se essencialmente por análise de espectrometria de massa e técnicas de imunodeteção (imunohistoquímica, imunocitoquímica, ELISA, *Western blott*), sendo estes métodos os preferíveis para medir a presença de HNE em amostras (Frijhoff *et al.*, 2015; Spickett, 2013).

## II. Malondialdeído

Dos compostos resultantes da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) ou 1,3-propanodial, é um produto secundário deste mecanismo, sendo considerado um indicador de *stress* oxidativo e utilizado como biomarcador (França *et al.*, 2013; Pubchem, s.d.; Santo, Zhu, & Li, 2016; Shestivska *et al.*, 2015; Tsikas, 2017). Esta molécula foi identificada pela primeira vez em 1951 através de um estudo científico realizado por Patton e Kurtz denominado de “*2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation*”, onde também se considera que este composto tem grande importância na oxidação biológica de ácidos gordos insaturados (Patton & Kurtz, 1951). Contudo, em uns anos antes, nomeadamente em 1944 num trabalho realizado por Kohn e Liversedge designado de “*On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and menadione*”, de uma forma inconsciente os investigadores neste estudo já utilizavam o MDA sem terem noção de que substância se se tratava, ou seja, os autores aquando do seu trabalho estavam a descrever pela primeira vez a reação calorimétrica do ácido tiobarbitúrico (TBA) com um composto desconhecido formado durante a incubação aeróbica de tecidos homogeneizados, composto esse que mais tarde se veio a concluir ser o malondialdeído (AUBOURG, 1993). Além deste artigo e ainda antes da identificação do MDA em 1951, Bernheim, Bernheim e Wilbur em 1948, com o artigo científico “*The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids*”, identifica a natureza do composto que dá cor na reação de TBA descrita por Kohn e Liversedge, afirmando que a coloração obtida deve-se a presença de um produto da oxidação de ácidos gordos insaturados, indo incidir no que foi descoberto por Patton e Kurtz (Bernheim, Bernheim, & Wilbur, 1948).

O malondialdeído, tal como mencionado anteriormente, é produto secundário da peroxidação lipídica, esta molécula é considerada a mais abundante dos produtos, como também, a mais bem conhecida e estudada deste processo. Este composto é um dialdeído resultante da  $\beta$ -cisão de ácidos gordos polinsaturados presentes nos fosfolípidos da membrana, sendo a principal fonte de obtenção de MDA *in vivo* (Calyniuk *et al.*, 2016; Karatas, Karatepe, & Baysar, 2002; Lykkesfeldt, 2007; Steppeler, Haugen, Rodbotten, & Kirkhus, 2016). É de referir ainda que, o processo de peroxidação de lípidos não é o único meio de obtenção de MDA endogenamente, apesar

de ser em menores quantidades, este também pode ser produzido através de processos enzimáticos, ou seja, através da biossíntese de prostaglandinas ou obtido como subproduto da geração de radicais livres por radiação ionizante (Lykkesfeldt, 2007; Niedernhofer, Daniels, Rouzer, Greene, & Marnett, 2003). Além das fontes endógenas de obtenção de MDA, este também é influenciado por fatores exógenos que potenciam o aumento das concentrações deste composto no corpo, nomeadamente, produtos alimentícios (vegetais, pão integral, carne e peixe), os produtos bebíveis (álcool), ou mesmo, através da inalação de fumo de tabaco (Rio, Stewart, & Pellegrini, 2005).

O MDA é um aldeído pequeno de cadeia curta sendo constituído apenas por 3 carbonos, onde integra dois grupos funcionais iguais (aldeídos) que o caracteriza, localizados nos carbonos 1 e 3 da cadeia (Figura 5) (Osawa, Felício, & Gonçalves, 2005). Este dialdeído apresenta uma fórmula molecular de  $C_3H_4O_2$  ou  $CH_2(CHO)_2$ , correspondendo a um peso molecular de 72.063 g/mol. É uma molécula com características polares, altamente solúvel em água e é um ácido moderadamente fraco ( $pK_a = 4.46$ ) (Grotto *et al.*, 2009; Lima, Saes, & Abdalla, 2001). Além do mais, o malondialdeído é considerado o produto secundário mais mutagénico da peroxidação lipídica, apresentando ainda na sua constituição propriedades genotóxicas, carciongénicas e tóxicas (é menos tóxico que o HNE), como também, alguma reatividade (muito menos reativo do que HNE e acroleína) principalmente devido às reações estabelecidas com proteínas e DNA (Antus, 2016; Ayala *et al.*, 2014; J. Chen *et al.*, 2015; Feng, Hu, Marnett, & Tang, 2006; Steppeler *et al.*, 2016).

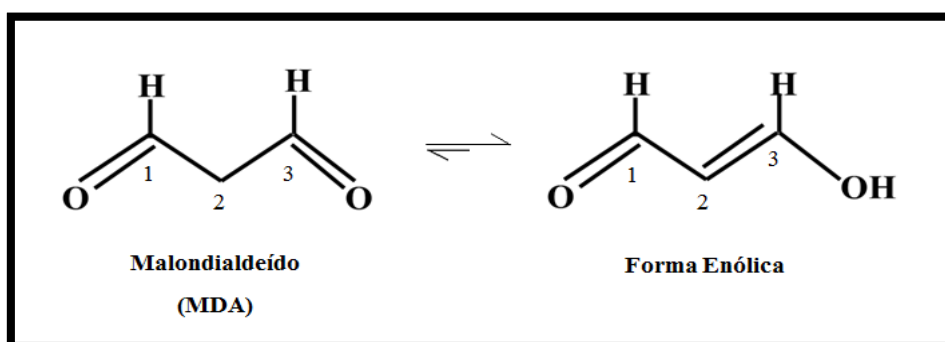


Figura 5. Fórmula Estrutural do Malondialdeído (adaptado de Calyniuk *et al.*, 2016).

Outra característica importante a referir é o facto de o MDA ser pH-dependente, ou seja, a sua reatividade está dependente das condições existentes no meio. Deste modo, em condições fisiológicas (a pH neutro ou mesmo em pH alcalino), esta molécula vai-se

encontrar maioritariamente sob a forma enólica (Figura 5), forma esta que é estável e apresenta pouca reatividade (mesmo nestas condições o MDA tem a capacidade de interagir e formar adutos; a molécula pode atuar quer como eletrófilo quer como nucleófilo). Contudo, se houver alterações a nível do pH do meio, ou seja, se o MDA se encontrar em condições ácidas, este composto torna-se instável, e a sua reatividade aumenta, estando então capaz de provocar diversos ataques e danos, como também, formar adutos (Ayala *et al.*, 2014; Janero, 1990).

Após a formação do malondialdeído pela peroxidação de lípidos, este composto pode passar por dois processos: ser metabolizado ou reagir com proteínas e DNA formando adutos (que vão provocar danos biomoleculares). Relativamente à biotransformação do MDA, este processa-se através da via enzimática e é rapidamente metabolizado (Skoumalová & Hort, 2012). De forma muito sucinta, o MDA presente no meio começa por ser oxidado pelo aldeído desidrogenase (ALDH) mitocondrial que forma o semialdeído malónico e de seguida o acetaldeído por descarboxilação. O acetaldeído formado sofre oxidação por parte do aldeído desidrogenase, que transforma esta molécula em acetato e conseqüentemente em acetil CoA por ação da sintetase acetil CoA. Por fim, o acetil CoA anteriormente formado entra no ciclo do ácido tricarbóxico onde se obtém como produtos finais CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, desintoxicando assim o malondialdeído (Ayala *et al.*, 2014; J. J. Chen & Yu, 1996; Guéraud *et al.*, 2010).

O malondialdeído por norma encontra-se nas amostras biológicas sob 2 formas, MDA livre ou MDA ligado com adutos. Na forma livre este é considerado como um marcador indicativo de potenciais lesões ou mesmo de danos recentes. Enquanto que, o MDA ligado a adutos (por exemplo, os que são detetados na urina) são associados a lesões mais antigas. Caso o MDA não sofra metabolização, este segue para a formação de adutos com diversas moléculas, processo este característico dos aldeídos devido à elevada reatividade que lhes é característica. Assim sendo, o MDA através de base de Schiff, pode formar adutos por reação com grupos amina (NH<sub>2</sub>) e tiol (SH-), de proteínas e DNA, como também, formar outros adutos MDA-DNA onde reage com, desoxiguanosina (dG), desoxiadenosina (dA) e a desoxicitidina (dC), formando respetivamente os adutos, M1dG (pirimidopurinona; aduto com maior mutagenicidade), M1A (N<sup>6</sup>-(3-oxopropenil)desoxiadenosina) e M1C (N<sup>4</sup>-(3-oxopropenil)desoxicitidina)

(Bamonti *et al.*, 2006; Erejuwa, Sulaiman, & Wahab, 2013; Grotto *et al.*, 2009; Janero, 1990; Lykkesfeldt, 2007; Zelzer *et al.*, 2013).

Por todas as características supramencionadas sobre o malondialdeído, muitas delas levam à ocorrência de consequências biológicas negativas, quer para a célula quer para o organismo. Algumas dessas ações negativas consistem na perda de potencial de proliferação e integridade das células, ocorrência de alterações a nível da permeabilidade da membrana que prejudica a fluidez da bicamada fosfolipídica, a indução de grandes inserções e deleções no DNA, alterações a nível da expressão génica e ocorrência de mutações, como também, o comprometimento da comunicação intercelular, disfunção orgânica e inibição de enzimas associadas à defesa das células contra o stress oxidativo (Calyniuk *et al.*, 2016; Erejuwa *et al.*, 2013; Santo *et al.*, 2016).

As alterações negativas provocadas pelo MDA vão culminar de certo modo em eventos não desejados no ser humano, que conseqüentemente levam ao surgimento de diversas doenças. Deste modo, esta molécula tem um vasto leque de patologias a si associado, nomeadamente, diabetes, asma, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), degeneração macular relacionada com a idade, fibrose cística, aterosclerose, pré-eclâmpsia, doenças cardiovasculares, doença de *Parkinson*, doença de *Alzheimer*, doenças neurodegenerativas, doenças auto-imunes, doenças hepáticas, dor abdominal aguda, leucemia linfocítica crónica, como também, o cancro (colon, mama, útero, pulmão e gástrico). Assim, a deteção de MDA torna-se uma ferramenta crucial quer para a monitorização da progressão de doenças, quer para encontrar formas de elucidar os mecanismos a ele subjacentes (Antus, 2016; J. Chen *et al.*, 2015; Rio *et al.*, 2005; Khoubnasabjafari, Ansarin, & Jouyban, 2015; Shestivska *et al.*, 2015).

De forma a proceder à deteção e quantificação de MDA em seres humanos, é necessário recorrer primeiramente a amostras biológicas. Por norma é possível encontrar elevadas quantidades deste composto em diversos locais, ou seja, no soro, plasma, urina, fezes e em tecidos (cérebro, fígado, pulmão, rim e coração), sendo que os mais frequentemente utilizados são o plasma (encontrado com concentrações entre 30 - 50  $\mu\text{M}$ ), urina e tecidos (Feng *et al.*, 2006; Grotto *et al.*, 2009; Il'yasova, Scarbrough, & Spasojevic, 2012; Steppeler *et al.*, 2016).

Existe atualmente diversos métodos disponíveis para a quantificação de MDA em fluidos biológicos, que vão desde os teste de TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), espectrofotometria, espectrometria de massa, métodos de HPLC, cromatografia líquida e gasosa, eletroforese, detecção a visível, ultravioleta e fluorescência, técnicas imunogénicas e HPCE (*High-Performance Capillary Electrophoresis*). Muitas destas técnicas são utilizadas em conjunto de forma a aumentar a sua sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, como também, através da utilização reagentes de derivatização otimizar a análise de MDA (Rio *et al.*, 2005; Shestivska *et al.*, 2015).

Um dos métodos mais antigo, popular e amplamente utilizado é o TBARS que se baseia na medição da quantidade de MDA libertada a partir de proteínas plasmáticas, este teste consiste na reação de condensação entre uma molécula de malondialdeído com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), que sob condições ácidas e de forte aquecimento vão formar um composto cromogéneo de cor vermelho fluorescente (MDA-TBA<sub>2</sub>) que posteriormente é medido por espectrofotometria ou fluorometria (espectrofotometria ou fluorescência) e lido a um comprimento de onda de 532 nm e 553 nm, respetivamente (Figura 6) (Antus, 2016; Khoubnasabjafari *et al.*, 2015; Santos-Fandila *et al.*, 2014).

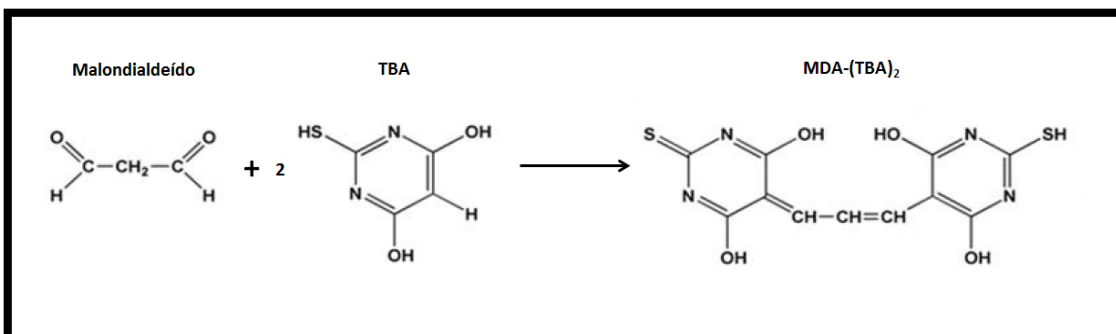


Figura 6. Reação entre o MDA e o TBA com conseqüente formação de um composto vermelho fluorescente (MDA-TBA<sub>2</sub>) (adaptado de Santos-Fandila *et al.*, 2014).

A medição através deste método é simples, rápido e de fácil execução, como também, de baixo custo. Contudo, o TBARS é um teste que apresenta algumas desvantagens e limitações, nomeadamente, a falta de especificidade (uma vez que o ácido tiobarbitúrico reage com uma variedade de compostos, açúcar, aminoácidos, proteínas, aminas, bilirrubina e outros aldeídos sem ser MDA) fazendo com que o TBARS seja

considerado um método geral de detecção de produtos da peroxidação lipídica e não só de MDA; falta de sensibilidade, fraca reprodutibilidade de resultados analíticos e baixa estabilidade do MDA em amostras biológicas devido a sua alta tendência em reagir com proteínas e aminoácidos. Muitas destas causas são justificadas por alterações durante o pré-tratamento, preparação e análise da amostra, como também, no seu armazenamento (a molécula uma vez que é instável, estando armazenada muito tempo acaba por formar álcoois orgânicos que não são detetáveis através destes teste) (Grotto *et al.*, 2009; Khoubnasabjafari *et al.*, 2015; Tsikas, 2017).

De forma a melhorar o teste de TBARS para a detecção de MDA, este é associado a outros métodos analíticos. Por norma o TBARS é associado a técnicas cromatográficas uma vez que são preferíveis, mais confiáveis e específicas, contudo, outras associações com TBARS são feitas, nomeadamente, com cromatografia líquida com detecção por fluorescência ou ultravioleta; HPLC com detecção UV/visível; Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa após derivação. Apesar de estes métodos contribuírem positivamente para a melhoria de detecção do MDA, alguns inconvenientes podem surgir, como por exemplo, algumas técnicas serem mais demoradas de realizar, ou mesmo, o fato de alguns laboratórios não apresentam os equipamentos necessários para a execução do ensaio devido aos custos associados (Antus, 2016; Grotto *et al.*, 2009; Khoubnasabjafari *et al.*, 2015; Rahal *et al.*, 2014; Tsikas, 2017).

## II. Acroleína

A acroleína (ACR), tal como, malondialdeído e o 4-hidroxinonal, é um produto secundário da peroxidação de lípidos. Este composto foi identificado pela primeira vez em 1839, por um químico sueco denominado de Jöns Jacob Berzelius, que através do seu trabalho sobre decomposição térmica de glicerol obteve um aldeído como produto final, da qual denominou-a de acroleína (Burcham, 2016; Stevens & Maier, 2008).

O produto secundário da peroxidação lipídica de ácidos gordos polinsaturados, a acroleína, também conhecida como 2-propenal ou acrilaldeído, é classificada como um aldeído  $\alpha,\beta$ -insaturado (Aizenbud, Aizenbud, Reznick, & Avezov, 2016; Navarro-Medina, Mercado-Pichardo, Hernández-Pérez, & Hicks, 1999). Esta molécula apresenta uma fórmula molecular de  $C_3H_4O$ , como um peso molecular correspondente de 56.064

g/mol (Pubchem, s.d.). O ACR é um aldeído pequeno, de cadeia curta, apresentando na sua constituição 3 carbonos, onde integra na estrutura dois grupos funcionais: um grupo alceno (representado pela ligação dupla entre os átomos de carbono 2 e 3) e um grupo aldeído (ligado ao carbono 1 da cadeia) (Figura 7) (Pizzimenti *et al.*, 2013).

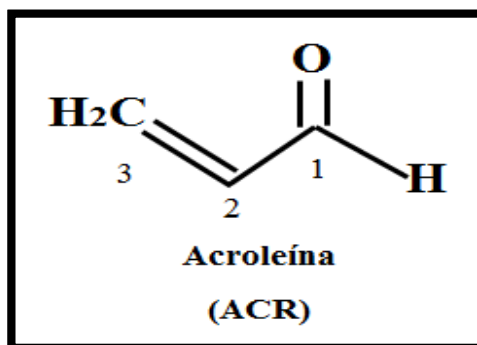


Figura 7. Fórmula Estrutural da Acroleína (adaptado de Aldini *et al.*, 2015).

Esta molécula apresenta alta reatividade (dos produtos da peroxidação lipídica a ACR é a mais reativa), reagindo rapidamente com locais nucleófilos de proteínas, DNA e fosfolípidos sendo através destas reações que ele provoca citotoxicidade e desse modo, desenvolve danos nos tecidos, sendo assim conhecida por ser um grande perigo para a saúde humana. Além disso, a acroleína é também um eletrófilo forte, explicando assim a sua forte reatividade para grupos amina e tiol dos resíduos de cisteína, histidina e lisina. É de referir ainda que, acroleína é um composto tóxico (mais que o 4-hidroxinonenal), apresenta uma semi-vida entre horas a dias e é solúvel em água, álcool e éter dietílico, características estas que dão a capacidade da molécula atravessar membranas por difusão passiva (Erejuwa *et al.*, 2013; Li, Wang, Kaphalia, Ansari, & Khan, 2004; Shi, Rickett, & Sun, 2011; Shibata, Uemura, Hosokawa, & Miyashita, 2015; Stevens & Maier, 2008; Takamatsu, Fukase, Oka, & Kitazume, 2016; Tully, Zheng, & Shi, 2015).

No que diz respeito às origens da acroleína, esta molécula pode ser encontrada de duas formas, exogenamente ou endogenamente. De forma exógena, este composto é considerado um poluente ambiental, estando presente no ar através de processos de combustão de matérias orgânicas ou de combustíveis (cravão, gasolina, madeiras,

plásticos e papel); em alimentos (pão, queijo, vinho, cerveja e café); no cozimento de gorduras, óleos e açúcares que proporcionam o aumento da concentração de acroleína; em produtos químicos como herbicidas; como também, no fumo de cigarros, uma vez que é um dos principais componentes do fumo. Deste modo, tendo em conta o que foi supramencionado, a acroleína apresenta um vasto leque de fontes relativos à sua molécula, com a capacidade de provocar toxicidade direta no homem, causando irritações na pele, olhos e danos no sistema respiratório (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Erejuwa *et al.*, 2013; Moghe *et al.*, 2015; Pizzimenti *et al.*, 2013; Singh, Kapoor, & Bhatnagar, 2015).

Relativamente às fontes endógenas de acroleína e as que tem mais interesse neste trabalho, esta molécula pode ser obtida de quatro formas: como produto da metabolização de aminoácidos, metionina e treonina, por ação da enzima mieloperoxidase presente nos neutrófilos; pelo catabolismo de poliaminas mediada pela amina oxidase; como produto metabólico de fármacos contra o cancro (Ex: ciclofosfamida); e por fim, como produto secundário da peroxidação de lípidos de ácidos gordos polinsaturados, sendo esta a principal via de obtenção de acroleína no corpo humano (apesar de existir em quantidades muito pequenas) (Aizenbud *et al.*, 2016; Faroon *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2004; Moghe *et al.*, 2015).

Uma vez formada a acroleína por meio da peroxidação lipídica, esta molécula pode sofrer duas ações pelo corpo, ou passa pela biotransformação ou forma adutos com biomoléculas. Relativamente à biotransformação, esta ocorre pela via enzimática, onde acontece a desintoxicação da molécula, sofrendo a ação de 4 enzimas diferentes, aldeído desidrogenase, epóxido hidrase, aldose redutase e glutathione. Através da ação do aldeído desidrogenase nos microsomas do fígado e do citosol, a acroleína é convertida em ácido acrílico; sob a presença de NADPH a ACR é convertida num epóxido glicidaldeído e de seguida em gliceraldeído pela ação da epóxi hidrolase. Quer o ácido acrílico quer gliceraldeído formados pela desintoxicação da acroleína ainda podem ser convertidos em dióxido de carbono. Para além da ação das duas enzimas anteriores, a acroleína pode ser reduzida a álcool alílico aquando da presença da aldose redutase. Por fim, e a via mais importante de metabolização da acroleína, ocorre através da conjugação da acroleína com a glutathione, que com ou sem a presença de um catalisador (glutathione-S-transferase), forma o ácido mercaptúrico, que é o principal metabolito da acroleína identificado na urina (Halder & Bhattacharyya, 2014; Kolb, Hunsaker, & Jagt,

1994). Ao esgotar-se a glutatona que promove o equilíbrio do meio, começa a ocorrer acumulação de acroleína no organismo, e, conseqüentemente, há a formação de adutos de proteínas e de DNA por parte da acroleína acumulada, que provoca ações indesejáveis para o corpo humano (Pizzimenti *et al.*, 2013). Assim sendo, a formação de adutos mencionada anteriormente pode ocorrer de duas formas, pela adição de Michael ou pelas bases de Schiff. Através da adição de Michael, este vai provocar modificação de grupos funcionais de amino, sulidrilo e imidazol dos resíduos de cisteína, lisina e histidina, formando adutos estáveis de acroleína com proteínas ou de DNA (a acroleína também pode reagir com o DNA formando adutos através do seu local nucleófilo). Como também, por ação das bases de Schiff que reage com grupo amino de aminoácidos, onde ocorrem ligações cruzadas (Aizenbud *et al.*, 2016; Dalle-Donne *et al.*, 2006; Halder & Bhattacharyya, 2014; Li *et al.*, 2004; Takamatsu *et al.*, 2016).

Quando ocorre a acumulação de acroleína no organismo, este pode provocar um grande número de efeitos negativos, dentro dos quais se podem destacar, a indução de morte celular, deterioração e degeneração de neurónios do hipocampo; alterações na fluidez da membrana e proliferação celular; interrupção da ação de alguns organelos (mitocôndrias, retículo endoplasmático e membranas); danificação de DNA; redução da captação de glutamato e de transporte de glicose; inibição das bombas de sódio e cálcio, bem como, de enzimas (aspartato aminotransferase, DNA-polimerase,  $\alpha$ -primase e  $\alpha$ 1-proteinase); modificação da transdução de sinal provocando defeitos que podem levar ao surgimento de doenças; como também, a presença de quantidades elevadas de acroleína faz aumentar ainda mais o *stress* oxidativo levando à ocorrência de apoptoses (Kwolek-Mirek, Bednarska, Bartosz, & Bilinski, 2009; Li *et al.*, 2004; Moghe *et al.*, 2015; Pizzimenti *et al.*, 2013).

Tendo em conta as ações que a acroleína exerce no corpo aquando do seu excesso este pode vir despoletar ou participar no surgimento de diversas patologias, nomeadamente, doenças cardiovasculares, doença de *Alzheimer*, doença de *Parkinson*, DPOC, aterosclerose, nefropatias, diabetes, lesão da medula espinhal, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, distúrbios da dor, inflamação crónica, tumores, doenças auto-imunes, hipertensão, alterações a nível do colesterol, assim como, pode estar associado a doentes com insuficiência renal crónica ou com problemas gastrintestinal (Erzsébet *et al.*, 2015; Kehrer & Biswal, 2000; Moghe *et al.*, 2015; Pizzimenti *et al.*, 2013; Takamatsu *et al.*, 2016; Tully *et al.*, 2015).

De modo a perceber a existência de acroleína no corpo humano ou numa determinada patologia, é necessário recorrer à análise de amostras biológicas. Dentro das amostras biológicas existentes, a acroleína pode-se encontrar no sangue, plasma, saliva, urina (metabolito presente em elevadas quantidades), fezes, como também, em diversos tecidos (cérebro, olhos, pele, pulmões, coração, fígado, rins, intestino, sistema reprodutor e bexiga) (Aizenbud *et al.*, 2016; Erzsébet *et al.*, 2015; Moghe *et al.*, 2015).

A maior parte das técnicas existentes para quantificação de acroleína, estão adaptadas para a medição de acroleína vindas de fontes exógenas, ou seja, obtidas por exemplo a partir de processos industriais ou da combustão do tabaco, uma vez que estas fontes são as que apresentam maiores valores desta molécula, sendo possível realizar quantificações diretas da acroleína através de técnicas de GC/MS e LC/MS (com reagente de derivatização), como também, por métodos indiretos de HPLC-UV e HPLC com deteção por fluorescência, ambas com uso de reagentes de derivatizações. Contudo, para a deteção de acroleína endógena estas técnicas apresentam limitações, nomeadamente, devido à grande reatividade que esta molécula apresenta, que provoca a diminuição da eficiência das derivatizações utilizadas nestas técnicas, bem como, ao fato de endogenamente a acroleína ser gerada em concentrações muito mais baixas comparada aos valores de fontes exógenas, dificultando assim a sua mediação. Deste modo, há a necessidade de encontrar técnicas que sejam capazes de resolver esta questão, que consigam ter a capacidade de pesquisar acroleína em concentrações mais pequenas, ou seja, que as técnicas quantitativas que venham a surgir sejam mais sensíveis para esta molécula (Erzsébet *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2004; Navarro-Medina *et al.*, 1999; Tully *et al.*, 2015).

Assim sendo, as três técnicas de quantificação que vêm facilitar a quantificação de acroleína em diversas amostras biológicas e em tecidos de interesse, são: a derivatização de acroleína seguida de LC/GC-MS; *immunoblotting* em anticorpos de acroleína (utilizando adutos de acroleína-proteína); e, o método baseado na quantificação de ácido 3-hidroxipropil mercaptúrico (3-HPMA; a quantificação é feita ao metabolito da acroleína que está presente na urina através de LC/MS/MS). Tal como todos os métodos analíticos existentes, estes apresentam vantagens e limitações associadas, e as técnicas mencionadas anteriormente não são exceção, deste modo, cabe ao investigador escolher o método que mais se adequa às suas necessidades e intenções de pesquisa, sendo por

vezes benéfico a combinação de teste para obter melhores resultados (Tully *et al.*, 2015).

### III. Isoprostanos

Os biomarcadores de peroxidação de lipídica, não se restringem apenas aos aldeídos anteriormente analisados como, o 4-hidroxinonenal, malondialdeído e a acroleína, existe também um outro grupo de moléculas que contribui em muito para a detecção e quantificação de *stress* oxidativo em lípidos, nomeadamente, os isoprostanos.

Os isoprostanos foram descritos pela primeira vez em 1990, por um grupo de investigadores através do artigo “*A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism*”, onde descobriram por mero acaso a 1<sup>o</sup> classe de isoprostanos (F<sub>2</sub>-Isoprostanos/F<sub>2</sub>-IsoPs) em humanos, compostos este semelhantes às prostaglandinas F<sub>2</sub> e considerados um produto da peroxidação lipídica. A descoberta deste marcador vem contribuir de forma bastante útil para pesquisa e quantificação do dano oxidativo quer *in vitro* quer *in vivo* causado por radicais livres (Milne, 2017; Morrow *et al.*, 1990; Roberts & Milne, 2009).

A classe dos F<sub>2</sub>-isoprostanos, descobertos em 1990, são isómeros com características semelhantes a prostaglandinas. A obtenção destes compostos faz-se através de processos *in vivo* de peroxidação não-enzimática de radicais livres sobre ácidos gordos polinsaturados, que advém especificamente do ácido araquidónico esterificado presente nos fosfolípidos de membranas celulares. É de realçar ainda que o ácido gordo polinsaturado mencionado anteriormente, não sofre qualquer tipo de ação da enzima cicloxigenase para a formação dos F<sub>2</sub>-isoprostanos, dependendo apenas da presença e ataque de radicais livres. Após a formação *in situ* de F<sub>2</sub>-IsoPs, estes sofrem clivagem e são libertados para a circulação por ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> e do ativador plaquetário acetilhidrolase (PAF-AH), sendo depois excretados na urina como isoprostanos livres (Czerska, Zieliński, & Gromadzińska, 2016; Erzsébet *et al.*, 2015).

Aquando da formação do F<sub>2</sub>-isoprostanos, este tem a capacidade de gerar 4 regioisómeros (e cada um deles é constituído por 8 diastereoisómeros racémicos), que podem ser designados de duas formas, ou através das serie 5, 8, 12, 15 (nomenclatura de

Taber; a sua seleção depende da posição em que se encontra o átomo de carbono ao qual o grupo OH da cadeia lateral está ligado.); ou consoante o tipo III, IV, V e VI (nomenclatura de Rokach; a sua seleção tem como base o número de carbono existentes entre o carbono ómega e a primeira ligação dupla) (Figura 8) (Cracowski & Durand, 2002; Musiek & Morrow, 2005).

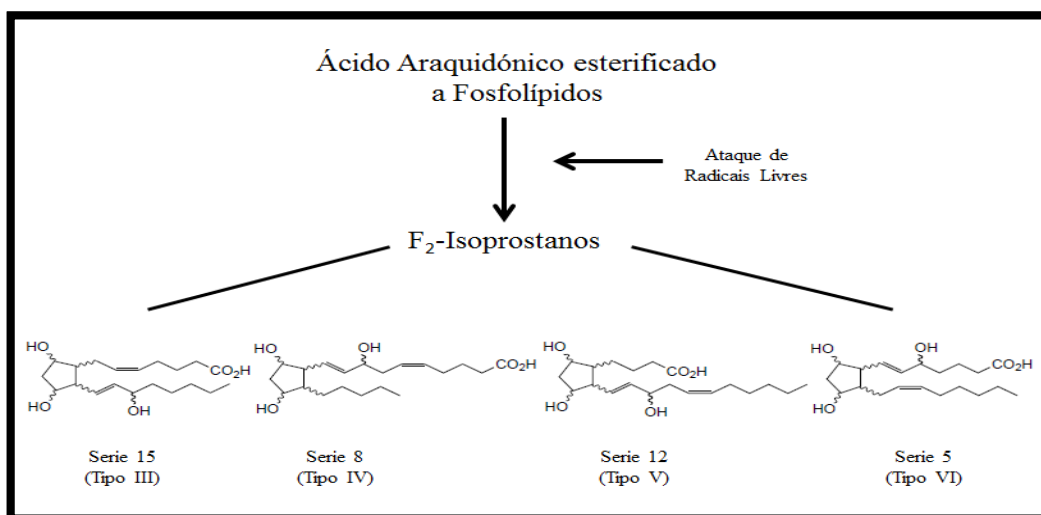


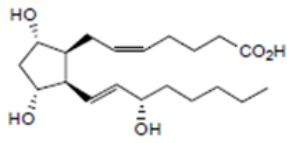
Figura 8. Imagem esquemática da formação de F<sub>2</sub>-Isoprostanos e os seus quatro regioisómeros (adaptado de Cracowski & Durand, 2002).

O novo marcador de peroxidação de lípidos, F<sub>2</sub>-IsoPs, é uma classe pertencente à família dos eicosanóides e é constituída por 64 prostaglandinas F<sub>2α</sub>. Estes compostos são o grupo mais bem estudado para a análise de peroxidação lipídica, formada *in vivo*, apresentando alta estabilidade e especificidade, características que contribuem para que o marcador seja dos mais precisos e de confiança para medição. Além do mais, estas moléculas são robustas, apresentam uma cadeia lateral em conformação *cis* voltada para o anel do ciclopentano, os métodos aplicados são não-invasivos apesar da sua difícil medição, dependentes da presença de radicais livres e estão presentes em quantidades detetáveis em todos os tecidos e fluidos biológicos (Czerska *et al.*, 2016; Milne, 2017; Montuschi *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2007).

De entre os diversos regioisómeros gerados pelo F<sub>2</sub>-isoprostano, o 8-isoprostaglandina F<sub>2α</sub> (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) é o mais abundante e popular dos biomarcador de peroxidação lipídica, tendo sido dos primeiros isómeros a ser sintetizado (Milne, 2017). Apesar de

ser denominado como 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, esta nomenclatura já não é muito usual uma vez que não permite a diferenciação das numerosas estruturas isométricas existentes, como tal, a nova nomenclatura para esta molécula pode ser apresentada de duas formas: segundo a nomenclatura de Taber, 15-F<sub>2t</sub>-IsoP; ou pela nomenclatura de Rokach, iPF<sub>2α</sub> – III (Tabela 3) (Cracowski & Durand, 2002). Esta molécula apresenta uma fórmula molecular de C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>, com um peso correspondente de 354,487 g/mol (Pubchem, s.d.).

Tabela 3. Imagem esquemática da fórmula estrutural do 8-iso-PGF<sub>2α</sub> e as suas três nomenclaturas (adaptado de Cracowski & Durand, 2002).

Estrutura Química	Nomenclatura Antiga	Nomenclatura de Taber	Nomenclatura de Rokach
	8-iso-PGF <sub>2α</sub>	15-F <sub>2t</sub> -IsoP	iPF <sub>2α</sub> -III

Relativamente à ação dos F<sub>2</sub>-isoprostanos, e consequentemente da 15-F<sub>2t</sub>-IsoP, estes apresentam uma potencial ação vasoconstritora (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Estas moléculas encontram-se essencialmente *in vivo*, onde apesar de existir quantidades mínimas em alguns alimentos, a sua obtenção por esses meios e a sua absorção no intestino não é significativa de forma a provocar alterações a nível da urina ou do plasma, como tal, os isoprostanos não são influenciados pelo teor de lípido da dieta estando dependente apenas de fatores endógenos (Frijhoff *et al.*, 2015). Como tal, a única forma até ao momento conhecida capaz de influenciar a produção de isoprostanos no meio é a variação da concentração de O<sub>2</sub> e a velocidade de metabolização destas moléculas, tornando-se assim uma vantagem comparativamente com os marcadores anteriormente abordados nesta monografia (Barra Ferreira Barbosa *et al.*, 2008; Czarska *et al.*, 2016). Tendo em conta que a presença e acumulação de 15-F<sub>2t</sub>-IsoP no organismo pode levar à estimulação ou contribuir para alterações de alguns mecanismos no corpo, estas ações podem variar deste, a ocorrência de broncoconstrição em doentes com asma, provocar a diminuição do fluxo renal ou induzir insuficiência renal, provocar o aumento

da atividade plaquetária em doentes com diabetes, como também, levar à estimulação de respostas proliferativas em fibroblastos (Montuschi *et al.*, 2004).

Deste modo, após a formação do 15-F<sub>2t</sub>-IsoP, esta molécula pode estar presente no plasma sob concentrações que variam entre 40 – 100 pg/mL e podem ser encontradas de 2 formas: esterificada a lípidos (forma mais abundante) ou na forma de ácido livre (Dalle-Donne *et al.*, 2006; H. & Breemen, 2010). Apresentando-se na forma livre este é rapidamente metabolizado e eliminado na urina, rapidez essa que dificulta posteriormente a sua quantificação prática (Halliwell & Lee, 2010). A metabolização desta molécula pode sofrer a ação da β-cisão ou ser reduzido para os metabolitos, 2,3-dinor-8-isoprostaglandina F<sub>2α</sub> e 2,3-dinor-5,6-dinor-8-prostaglandina F<sub>2α</sub>, respetivamente. Os metabolitos obtidos são encontrados na urina em quantidades significativas, tornando a sua mediação através desta amostra biológica um método de eleição, devido ao meio utilizado não ser invasivo, podendo ainda através da sua análise demonstrar o estado de oxidação integrada no tempo, sendo considerado um potencial biomarcador de lesões oxidativas (Halliwell & Lee, 2010; Milne, 2017).

Tal como referido anteriormente, o sucessivo aumento e acumulação de F<sub>2</sub>-isoprostanos podem provocar alterações ou mesmos danos no organismo, desse modo, a sua presença no organismo pode estar associado a diversas patologias, nomeadamente, doença cardiovascular (Ex: aterosclerose, isquemia/lesão de reperfusão, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, etc), doenças neurológicas (doença de *Alzheimer*), inflamação aguda/crónica, diabetes, doenças pulmonares (Ex: asma, DPOC, doença intersticial pulmonar, insuficiência respiratória), esclerose múltiplas, lúpus eritematoso sistémico, fibrose cística, doenças hepáticas, obesidade, ou mesmo, cancro. Por vezes, estas moléculas encontram-se associadas ao tabagismo, como também, a mecanismos de envelhecimento a longo prazo, que pode provocar danos oxidativos relevantes devido a processos de peroxidação lipídica continua (Halder & Bhattacharyya, 2014; Milne, 2017; Musiek & Morrow, 2005).

De forma a realizar as técnicas analíticas para proceder à mediação e deteção do 15-F<sub>2t</sub>-IsoP no organismo, é necessário recorrer primeiramente a amostras biológicas. Tal como já referido, esta molécula encontra-se distribuído pelo organismo e em diversos tecidos, nomeadamente, no soro, plasma, saliva, urina, fluido de lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquidiano (LCR), bÍlis, linfa, condensado de respiração expirada, como também, fluido sinovial e amniótico. Assim, de entre essas amostras o plasma e urina

são considerados as amostras de eleição para análise e as que dão um índice mais preciso e exato de *stress* oxidativo (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Janicka, Kot-Wasik, Kot, & Namiesnik, 2010).

Atualmente existem diversos métodos disponíveis para quantificação de F<sub>2</sub>-Isoprostanos, nomeadamente, GC-MS, GC/MS/MS, LC/MS/MS, GC/NICI-MS (Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa com ionização química negativa), como também, técnicas imunológicas (ELISA e RIA). De entre as técnicas analíticas mencionadas, a GC/NICI-MS é considerada o método de referência para a medição de F<sub>2</sub>-isoprostanos, devido à sua alta sensibilidade, especificidade e confiabilidade, contudo é uma técnica demorosa e relativamente cara. Em alternativa, os testes imunológicos apesar da sua limitada precisão e especificidade (ocorrência de reações de cruzadas), estes têm vindo a sobressair-se devido à sua fácil aplicação e baixos custos, tornando-se assim o método mais usados na medição da oxidação lipídica (Chandra, Panchatcharam, & Miriyala, 2016; Dalle-Donne *et al.*, 2006; França *et al.*, 2013; Musiek & Morrow, 2005).

### **2.3.2. Proteínas: Oxidação Proteica**

De entre as inúmeras moléculas presentes no organismo e as suas diversas funcionalidades, existe uma que é crucial para todos os seres vivos, as proteínas. Esta molécula complexa, constituída por diversos aminoácidos, está envolvida num vasto número de processos fundamentais para o bom desempenho celular, processos esses que vão desde a sua função de transportador, mensageiro, sinalizador e regulador dos tecidos e órgãos do corpo, como também, a sua importante função suporte e estrutura de diversas células, tornando a sua presença essencial para a manutenção e ocorrência de vida (Cecarini *et al.*, 2007; Zong, Liu, Guo, & Sun, 2011).

Contudo, tal como acontece em muitas outras moléculas, as proteínas também estão sujeitas a sofrer danos por diversos mecanismo. Uma vez que é um composto que apresenta alguma reatividade devido aos seus grupos funcionais e está presente em maior abundancia nas células e no organismo, esta molécula torna-se um alvo preferencial de ataque de espécies reativas de oxigénio (ROS), estando sujeito a sofrer modificações quer a nível da sua atividade biológica quer da sua estrutura (Bo, Martini,

Porrini, Klimis-Zacas, & Riso, 2015; Erzsébet *et al.*, 2015; Höhn, König, & Grune, 2013).

Desse modo, a oxidação proteica por ação de espécies reativas de oxigênio consiste numa modificação das características covalentes de uma determinada proteína que pode ocorrer de forma direta ou indireta, causando alterações estruturais na molécula, que pode ir desde a fragmentação das proteínas, oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos ou mesmo formando ligações cruzadas proteína-proteína (Trnkova, Drsata, & Bousava, 2015; Yk, 2016). Estas alterações estruturais trazem consigo modificações negativas para as proteínas, e conseqüentemente, para as próprias células e organismo, uma vez que vai afetar diversas funções que estão associadas à sua ação. Assim sendo, a ocorrência de agregações de cadeias peptídicas, modificações de carga elétrica das proteínas, a exposição de resíduos hidrófobos, a dissociação de subunidades, vias de sinalização, proteínas de transporte e recetores afetados, alteração da atividade enzimática, bem como, a indução de apoptose ou necrose, são algumas conseqüências que podem surgir por ação das ROS nas proteínas (Domenico, Coccia, Butterfield, & Perluigi, 2011; Dunlop, Brunk, & Rodgers, 2009; Lobo *et al.*, 2010; Trnkova *et al.*, 2015).

No que diz respeito à oxidação proteica, as espécies reativas de oxigênio podem causar dois tipos de oxidações nas proteínas, as de efeito reversível ou irreversível. Relativamente à oxidação de efeito reversível, este processo está envolvido na regulação de estruturas e das funções das proteínas, bem como, nas vias de sinalização, onde após a ocorrência de *stress* oxidativo as proteínas conseguem volta à sua forma nativa recuperando assim os aminoácidos. A cisteína e a metionina, são alguns dos resíduos de aminoácidos que sofrem este tipo de oxidação por parte da ROS. A oxidação em resíduos de cisteína ocorrer a nível do grupo tiol do aminoácido, uma vez que é o local mais suscetível ao ataque da ROS, levando à formação de S-sulfenação, S-nitrosilação, S-glutationilação, dissulfetos. Quanto aos resíduos de metionina o grupo atingido é o tioéter, onde há a formação de sulfóxido de metionina. (Cai & Yan, 2013; Erzsébet *et al.*, 2015; Naskaski & Bartsosz, 2001; Phaniendra & Babu, 2015; Yan, 2014).

A oxidação de efeito irreversível causada por ação das ROS é um processo que leva à perda da função proteica e à ocorrência de acumulação ou degradação das proteínas, que conseqüentemente conduz a dois tipos de modificações, a formação de proteínas

carboniladas e a nitrotirosina. Estes dois produtos oxidação proteica de efeitos irreversíveis, são por norma associados ao dano por *stress* oxidativo, e desse modo são utilizados como biomarcadores para avaliar a oxidação em diversas patologias (Cai & Yan, 2013; Naskaski & Bartsosz, 2001; Phaniendra & Babu, 2015; Yan, 2014).

### **2.3.2.1. Biomarcadores de Oxidação Proteica**

#### **I. Proteínas Carboniladas**

A oxidação proteica pode resultar na formação de diversos produtos, podendo estes ser ou não recuperados após oxidação. De entre os produtos de oxidação de efeito irreversível, as proteínas carboniladas são as preferenciais para a medição do *stress* oxidativo, devido à acessibilidade que este grupo tem em relação aos resíduos de aminoácido, caso que não acontece com a nitrotirosina, uma vez que é altamente seletivo e nem todas proteínas ou os resíduos de tirosina conseguem sofrer nitração (Cai & Yan, 2013).

Relativamente às proteínas carboniladas, mais precisamente ao grupo carbonilo, este é quimicamente estável (sendo uma vantagem comparativamente aos produtos da peroxidação lipídica como marcadores de *stress* oxidativo), é irreversível e as modificações ocorridas por ele são irreparáveis. Além do mais, as proteínas carboniladas apresentam na sua constituição, um átomo de carbono e outro de oxigénio ligados entre si por uma ligação dupla, esta estrutura é comumente encontrada em determinados grupos funcionais bem conhecidos, nomeadamente, os aldeídos e as cetonas. Assim sendo, o grupo carbonilo vai sendo introduzido nas cadeias laterais de diversos aminoácidos devido ao processo de oxidação a que ele é sujeito (Bo *et al.*, 2015; Domenico *et al.*, 2011; Erzsébet *et al.*, 2015; Thanan *et al.*, 2015).

O ataque das ROS a aminoácidos pode ser induzido por diversas espécies, podendo ser elas radicalares (ião superóxido, radicais hidróxilo, peróxilo, alcóxido e hidroperóxido), como também, não radicalares (ácido hipocloroso, peróxido de hidrogénio, ozono, singlete de oxigénio) (Phaniendra & Babu, 2015; Weber, Davies, & Grune, 2015). A reação ocorrida entre estas espécies reativas e os aminoácidos podem levar à formação de ligações de proteínas e provocar a libertação do grupo carbonilo. A formação de proteínas carboniladas pode ocorrer de diversas formas, nomeadamente, através da

oxidação direta de ROS aos resíduos de aminoácidos (lisina, arginina, prolina, treonina, histidina) ou por clivagem oxidativa da cadeia principal da proteína (por meio da via de  $\alpha$ -amidação ou por oxidação da cadeia lateral do glutamato). Além do mais, existem ainda outras vias de oxidação para a obtenção de proteínas carboniladas, as indiretas. Essas oxidações podem ocorrer através da oxidação de lípidos, que pelo processo de peroxidação de lipídica, onde se obteve aldeídos reativos (HNE, MDA e acroleína), vão reagir e formar adutos com resíduos de cisteína, histidina, arginina e lisina pela adição de Michael; ou também, através do processo de redução de açúcares ou de outros produtos de oxidação (por meio da glicação ou glicoxidação) que ao reagirem com resíduos de aminoácido formam grupos carbonilo (Dalle-donne, Giustarini, Colombo, Rossi, & Milzani, 2003; Dalle-Donne *et al.*, 2006; Phaniendra & Babu, 2015; Weber *et al.*, 2015).

De entre os processos anteriormente descritos, a oxidação direta de resíduos de aminoácidos é o processo que melhor descreve a oxidação proteica, utilizando como marcador de *stress* oxidativo a proteínas, o grupo carbonilo. Os resíduos de aminoácido que sofreram oxidação direta por este processo formam os seguintes produtos: o semialdeído glutâmico (resíduos de aminoácidos de prolina e arginina), semialdeído aminoalípico (resíduos de aminoácido lisina), ácido 2-amino-3-cetobutírico (resíduos de aminoácido de treonina) e 2-oxo-histidina (resíduos de aminoácidos de histidina), sendo estes posteriormente medidos por métodos analíticos (Figura 9) (Phaniendra & Babu, 2015; Thanan *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2015).

Tendo em conta todas as modificações ocorridas anteriormente para a formação dos produtos de oxidação proteica, e mais especificamente dos grupos carbonilo, o aumento da concentração e consequente acumulação no organismo, está associado ao desenvolvimento de um vasto leque de patologias, de entre as quais podemos destacar, as doenças de *Alzheimer*, *Parkinson* e *Huntington*, doenças respiratórias (síndrome de dificuldade respiratória, doença pulmonar crónica, displasia broncopulmonar), aterosclerose, diabetes, amiloidose, pré-eclâmpsia, fibrose cística, pancreatite aguda, insuficiência renal crónica, lesão isquémia/reperfusão, artrite reumatoide, esclerose lateral amiotrófica, síndrome de *Werner* e progeria, bem como, sépsis grave e o cancro. Além destas patologias, o fumo de tabaco e o processo de envelhecimento também estão associadas à presença de níveis elevados de proteínas carboniladas no organismo (Phaniendra & Babu, 2015; Thanan *et al.*, 2015; Trnkova *et al.*, 2015).

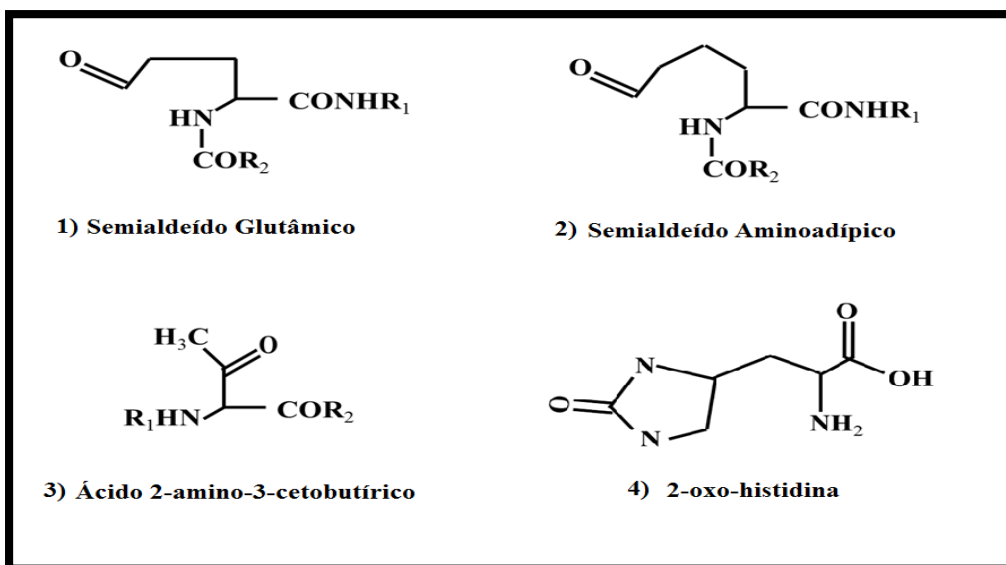


Figura 9. Estrutura dos grupos de carbonilo produzidos pela oxidação direta da cadeia lateral de aminoácidos. 1) Semialdeído Glutâmico obtido de resíduos de Prolina e Arginina; 2) Semialdeído Aminoalifático obtido de resíduos de Lisina; 3) Ácido 2-amino-3-cetobutírico obtido de resíduos de Treonina; 4) 2-oxo-histidina obtido de resíduos de Histidina (adaptado de Dalle-donne *et al.*, 2003).

No que concerne aos métodos analíticos de detecção de grupos carbonilo, estes podem ser realizados recorrendo ao uso de amostras biológicas, nomeadamente, o plasma. (Bo *et al.*, 2015). De seguida, para se proceder à análise analítica em si, é necessário realizar primeiramente uma derivatização do grupo carbonilo com o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) que forma um aduto estável proteína-DNPH, que é detetado por espectrofotometria a um comprimento de onda de 370 nm. Esta derivatização é necessária para qualquer método que seja realizado, uma vez que as proteínas carboniladas não são detetadas diretamente devido à ausência propriedades físico-químicas específicas (falta de absorção e de fluorescência). Assim sendo, de entre as diversas técnicas analíticas disponíveis, os métodos baseados em HPLC e ELISA, são os mais utilizados hoje em dia, devido ao seu alto rendimento e padronização, como também, à sua sensibilidade (Bo *et al.*, 2015; Erzsébet *et al.*, 2015; Marrocco, Altieri, & Peluso, 2017).

### 2.3.3. DNA: Oxidação de Ácidos Nucleicos

A ocorrência de vida tal como a conhecemos e sua permanente existência na terra deve-se essencialmente à presença de uma molécula muito importante, denominada de, ácido desoxirribonucleico (DNA). Esta molécula encontra-se presente nas células de todos os organismos, desde as bactérias até ao ser humano, onde tem em si armazenado toda a informação genética necessária para o crescimento, desenvolvimento e reprodução de vida. O DNA apresenta na sua estrutura três grupos essenciais para a sua constituição, um grupo fosfato, uma pentose (desoxirribose) e quatro bases azotadas (adenina, citosina, guanina e timina), onde estas bases podem ser pirimídicas (citosina e timina) ou púricas (adenina e guanina) (Barra Ferreira Barbosa *et al.*, 2008; Travers & Muskhelishvili, 2015; Udupa & Hallikeri, 2016).

Contudo, tal como acontece nos lípidos e proteínas, o DNA também está sujeito a sofrer danos por diversas vertentes (apesar de ser com menor frequência), quer através da má incorporação de bases azotadas durante o processo de replicação, por dano hidrolítico onde resulta a desaminação de bases e por fim, dano oxidativo provocado por ação de radicais livres (Udupa & Hallikeri, 2016). De entre os vários tipos de DNA, o DNA mitocondrial é o mais suscetível ao ataque das ROS comparativamente com o DNA nuclear, uma vez que o mitocondrial apresenta maior proximidade à cadeia respiratória, como também, por não ter a presença de proteínas nucleares capazes de conferir proteção à molécula (Dąbrowska & Wiczowski, 2017).

A espécie reativa de oxigénio que causa maior dano à estrutura de DNA é o radical hidróxilo. Este radical é gerado pela reação entre iões de metais de transição com o peróxido de hidrogénio, através de um processo denominado de reação de Fenton. Desse modo, após a formação do radical livre, o hidróxilo tem a capacidade de reagir e atacar a molécula de DNA provocando inúmeras alterações na sua molécula, dentro das quais, quebra de ligações simples ou duplas, modificações e troca de bases azotadas, formação de grandes obstáculos dentro da cadeia de DNA, mutações e translocações, deleções, como também, a formação de adutos (MDA; proteínas e produtos de glicoxidação) (Al-Dalaen & Al-Qtaitat, 2014; Colak, 2008; N. Dąbrowska & Wiczowski, 2017). Estas alterações têm posteriormente implicações negativas para com as células, que vão desde, a despolarização da membrana celular, redução de concentrações de ATP nas células, aumento da concentração de iões cálcio e

permeabilidade da membrana celular, oxidação de nucleótidos e diminuição dos níveis de glutathione. Assim, todas as alterações anteriormente mencionadas provocam repercussões negativas no organismo, culminando em eventos mutagênicos ou mesmo carcinogênicos (Dąbrowska & Wiczkowski, 2017; Marrocco *et al.*, 2017).

Visto que, o radical mais abundante e mais danoso provoca ao DNA, é o radical hidróxilo, as ROS pode reagir de duas formas com as bases de DNA, nomeadamente, através das bases púricas, onde ocorre a formação de diversos produtos dentro dos quais se destaca o 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG); ou por interação com as bases pirimídicas, que entre os vários compostos formados, o 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5-OHdU), se sobressai. Desse modo e devido a determinadas características que as moléculas anteriormente formadas apresentam, a 8-OHdG e 5-OHdU são destacadas como marcadores da extensão de danos oxidativos em DNA (Colak, 2008; Marrocco *et al.*, 2017).

### **2.3.3.1. Biomarcadores de Oxidação de Ácidos Nucléicos**

#### **I. 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) e 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5-OHdU)**

A oxidação de ácidos nucleicos, através do ataque do radical hidróxilo ao carbono 8 da guanina, fez resultar na formação de um marcador bastante útil para a deteção da lesão por ação oxidativa, nomeadamente, o 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (Figura 10). Este composto apresenta uma fórmula molecular de  $C_{10}H_{13}O_5$  com um peso molecular correspondente de 283.244 g/mol, é uma molécula altamente mutagénica, que se encontra em grandes quantidades, com características estáveis, sendo um dos compostos mais bem estudados (Pubchem, s.d.).

A 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina devido à sua grande capacidade de atravessar membranas celulares, este pode ser encontrado em amostras de urina e soro, além destes, é possível também detetar o 8-OHdG em amostras de plasma, saliva e tecidos (Colak, 2008; Frijhoff *et al.*, 2015). Através da utilização destas amostras biológicas é possível verificar a existência de quantidades elevadas deste composto em múltiplas patologias, nomeadamente, em diversos cancros, aterosclerose, diabetes, doenças neurodegenerativas (doenças de *Parkinson* e de *Alzheimer*), doenças auto-imunes

(artrite reumatoide e lúpus), como também, está presente nos mecanismos de envelhecimento (Dąbrowska & Wiczowski, 2017).

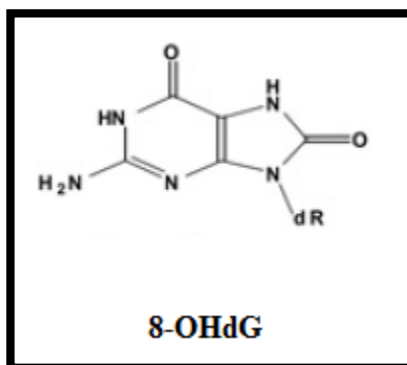


Figura 10. Fórmula Estrutural do 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (adaptado de Loft *et al.*, 2008).

De forma a se conseguir detetar e medir as lesões causadas pelos radicais livres no DNA, é necessário recorrer a determinados métodos analíticos. Para a deteção de 8-OdG, existe um vasto leque de opções disponíveis, podendo a sua medição ser realizada de duas formas: por métodos diretos ou indiretos. Dentro dos métodos diretos podemos destacar, HPLC com deteção eletroquímica, HPLC-MS/MS, LC-MS/MS, GC-MS e marcação com fósforo radioativo ( $^{32}\text{P}$ ). Relativamente aos métodos indiretos encontram-se, o ensaio *comet*, eluição alcalina, ELISA, RIA e PCR (reação em cadeia polimerase). Tendo em contas os métodos anteriormente referidos, o HPLC e ELISA são os mais frequentemente utilizados, contudo, apesar da alta precisão e sensibilidade conferida pelo método de HPLC, este é um teste complexo e demoroso, sendo por vezes substituído por uma alternativa mais simples como a ELISA (Bo *et al.*, 2015; Dąbrowska & Wiczowski, 2017; Shah, Mahajan, Sah, Nath, & Paudyal, 2014).

Outro marcador de grande interesse para a medição do dano oxidativo em aminoácidos é o 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5-OHdU). Este composto apresenta uma formula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_6$  com um peso molecular correspondente de 258.23 g/mol (Figura 11) (Pubchem, s.d.). Apesar da pouca informação disponível, o 5-OHdU é dos principais produtos obtidos pela oxidação da base azotada timina. Verificou-se que a presença de elevadas concentrações desta molécula em tecidos de DNA está associado ao cancro da mama, uma vez que os seus anticorpos foram quantificadas em amostras

de sangue, através do método imunológico, ELISA (Bo *et al.*, 2015; Virgilio *et al.*, 2015).

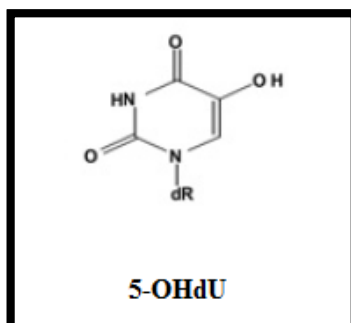


Figura 11. Fórmula Estrutural do 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5-OHdU) (adaptado de Loft *et al.*, 2008).

## CONCLUSÃO

A presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo é um fenómeno inevitável de acontecer. Porém, para evitar a ocorrência de danos por parte das ROS, a ação de espécies antioxidantes contra estes torna-se crucial para manter o equilíbrio celular.

Todavia, a eficácia de atuação dos antioxidantes para com as espécies reativas de oxigênio podem por vezes não ser o suficiente, desencadeando o aparecimento de mecanismos de *stress* oxidativo.

Devido às dificuldades de deteção e quantificação destas espécies reativas no organismo, houve a necessidade de recorrer a biomarcadores para auxiliar na perceção da extensão do dano oxidativo e as lesões causadas por eles.

De uma forma geral, todos os marcadores biológicos designados para a avaliação do *stress* oxidativo são uma mais-valia para a investigação científica. Contudo, apesar dos largos anos de pesquisas e estudos neste campo da ciência, ainda existe muitas informações para decifrar, muitos mecanismos para esclarecer, bem como, o aperfeiçoamento de várias técnicas analíticas de modo a que se encontre um método de eleição, que reúna entre si, a sensibilidade, especificidade, eficácia de tempo e os baixos custos necessários.

Uma outra grande limitação para a pesquisa de marcadores biológicos para o estudo do *stress* oxidativo recai sobre o uso de amostras biológicas. Tal como acontece na maioria das investigações de estudos *in vivo* e *in vitro* é inevitável não recorrer a este tipo de amostras, mas devido aos baixos recurso ou dificuldade na obtenção da mesma torna-se um obstáculo para o avanço científico.

Deste modo, e apesar de todos os excelentes resultados e avanços realizados até ao momento neste campo de estudos, os investigadores ainda irão se deparar com diversos desafios de futuro.

**BIBLIOGRAFIA**

- Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 306(1–2), 1–17. [http://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00393-X](http://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00393-X)
- Aizenbud, D., Aizenbud, I., Reznick, A. Z., & Avezov, K. (2016). Aldehyde : A Review of Oral Cavity Exposure and Oral Pathology Effects. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 7(3), 1–11. <http://doi.org/10.5041/RMMJ.10251>
- Al-Dalaen, S. M., & Al-Qtaitat, A. I. (2014). Review article : Oxidative stress versus antioxidants. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2(5), 60–71. <http://doi.org/10.11648/j.bio.20140205.11>
- Aldini, G., Domingues, M. R., Spickett, C. M., Domingues, P., Altomare, A., Sánchez-gómez, F. J., ... Pérez-sala, D. (2015). Redox Biology Protein lipoxidation : Detection strategies and challenges. *Redox Biology*, 5, 253–266. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.003>
- Ali, A. S., & Naaz, I. (2013). Earthworm biomarkers: The new tools of environmental impact assessment. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 6(2), 163–169.
- Amir-Aslani, A., & Mangematin, V. (2010). The future of drug discovery and development: Shifting emphasis towards personalized medicine. *Technological Forecasting and Social Change*, 77(2), 203–217. <http://doi.org/10.1016/j.techfore.2009.09.005>
- Amorim, L. C. A. (2003). O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. *Revista Brasileira de Medicina Do Trabalho*, 1(2), 124–132.
- Antus, B. (2016). Oxidative Stress Markers in Sputum. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 12. <http://doi.org/10.1155/2016/2930434>
- Arango, S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 75–82.

- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199–212. <http://doi.org/10.1007/s11746-998-0032-9>
- Atkinson, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., ... Zeger, S. L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95. <http://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- AUBOURG, S. P. (1993). Interaction of malondialdehyde with biological molecules - new trends about reactivity and significance. *International Journal of Food Science & Technology*, 28(4), 323–335. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb01278.x>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation : Production , Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–31. <http://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Azzi, A., Davies, K. J. A., & Kelly, F. (2004). Free radical biology – terminology and critical thinking. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 558(1–3), 3–6. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01526-6](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01526-6)
- Bamonti, F., Novembrino, C., Ippolito, S., Soresi, E., Ciani, A., Lonati, S., ... Cighetti, G. (2006). Increased free malondialdehyde concentrations in smokers normalise with a mixed fruit and vegetable juice concentrate: A pilot study. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(4), 391–395. <http://doi.org/10.1515/CCLM.2006.084>
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. C. G., Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, 23(4), 629–643.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. de C. G., Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2008). Estresse oxidativo : avaliação de marcadores. *Nutrire Revista Da Sociedade Brasileira de Alimentação E Nutrição*, 33(2), 111–128.

- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. de C. G., Paula, S. O., Minin, V. P. R., & Bressan, J. (2008). Estresse oxidativo : avaliação de marcadores. *Nutrire: Revista Da Sociedade Brasileira de Alimentação Nutricional*, 33(2), 111–128.
- Barbosa, K., Costa, N., Paula, S. O., Minin, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, 23(4), 629–643. <http://doi.org/10.1159/000320546>
- Barra Ferreira Barbosa, K., Maria Brunoro Costa, N., Cássia Gonçalves Alfenas, R. DE, Oliveira Paula, S. DE, Paula Rodrigues Minin, V., Bressan, J., & Barbosa, F. (2008). Estresse oxidativo: avaliação de marcadores Oxidative stress: assessment of biomarkers. *Food Nutr*, 33(2), 111–128.
- Benedetti, A., Comporti, M., & Esterbauer, H. (1980). Identification Of 4-Hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 620, 281–296.
- Bernheim, F., Bernheim, M. L. C., & Wilbur, K. M. (1948). The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipides. *Journal of Biological Chemistry*, (4), 257–264.
- Bhattacharjee, S. (2014). Membrane lipid peroxidation and its conflict of interest : the two faces of oxidative stress. *Current Science*, 107(11), 1811–1823.
- Bleavins, M. R., Carini, C., Jurima-Romet, M., & Rahbari, R. (2010). Biomarkers. In S. C. Gad (Ed.), *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development and Manufacturing* (pp. 1–18). United States of American: John Wiley & Sons.
- Blumberg, J. (2004). Use of Biomarkers of Oxidative Stress in Research Studies. *American Society for Nutritional Sciences*, 134, 3188–3189.
- Bo, C. D., Martini, D., Porrini, M., Klimis-Zacas, D., & Riso, P. (2015). Berries and oxidative stress markers: as overview of human intervention studies. *Royal Society of Chemistry*, 28. <http://doi.org/10.1039/c5fo00657k>

- Breitzig, M., Bhimineni, C., Lockey, R., & Kolliputi, N. (2016). 4-Hydroxy-2-nonenal : a critical target in oxidative stress? *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 311, 537–543. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00101.2016>
- Budimir, D., Polasek, O., Marusić, A., Kolčić, I., Zemunik, T., Boraska, V., ... Rudan, I. (2011). Ethical aspects of human biobanks: a systematic review. *Croatian Medical Journal*, 52(3), 262–279. <http://doi.org/10.3325/cmj.2011.52.262>
- Burcham, P. C. (2016). Acrolein and Human Disease : Untangling the Knotty Exposure Scenarios Accompanying Several Diverse Disorders. *Chemical Research in Toxicology*, 1–68. <http://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00310>
- Cai, Z., & Yan, L. (2013). Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 1(1), 15–26.
- Calyniuk, B., Grochowska-Niedworok, E., Walkiewicz, K. W., Kawecka, S., Popiolek, E., & Fatyga, E. (2016). Malondialdehyde (MDA) - product of lipid peroxidation as marker of homeostasis disorders and aging. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*, 70, 224–228. <http://doi.org/10.18794/aams/65697>
- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Maria, A., & Keller, J. N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis : Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773, 93–104. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.039>
- Chandra, M., Panchatcharam, M., & Miriyala, S. (2016). Biomarkers in ROS and Role Isoprostanes in Oxidative Stress. In *Free Radicals and Diseases* (pp. 131–148). <http://doi.org/dx.doi.org/10.5772/64706>
- Chen, J. J., & Yu, B. P. (1996). Detoxification of reactive aldehydes in mitochondria: effects of age and dietary restriction. *Aging Clinical and Experimental Research*, 8(5), 334–340.
- Chen, J., Zeng, L., Xia, T., Li, S., Yan, T., Wu, S., ... Liu, Z. (2015). Toward a Biomarker of Oxidative Stress: A Fluorescent Probe for Exogenous and Endogenous Malondialdehyde in Living Cells. *Analytical Chemistry*, 87(16), 8052–8056. <http://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02032>

- Chen, Z., Niki, E., & Vella, F. (2006). Is There An Answer ? 4-Hydroxynonenal ( 4-HNE ) has been Widely Accepted as an Inducer of Oxidative Stress . Is this the Whole Truth about it or can 4-HNE also exert Protective Effects ?\*. *Taylor & Francis Group*, 58(June), 372–373. <http://doi.org/10.1080/15216540600686896>
- Colak, E. (2008). NEW MARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE TO MACROMOLECULES. *Institute of Medical Biochemistry*, 27(1), 1–16. <http://doi.org/10.2478/v10011-007-0049-x>
- Costa, L. G. (1996). Biomarker research in neurotoxicology: The role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environmental Health Perspectives*, 104(SUPPL. 1), 55–67. <http://doi.org/10.1289/ehp.96104s155>
- Cotinguiba, G. G., Silva, J. R. do N., Azevedo, R. R. de S., Rocha, T. J. M., & Santos, A. F. (2013). Método de Avaliação da Defesa Antioxidante : Uma Revisão de Literatura Methods of the Antioxidant Defense : A Literature Review, 15(3), 231–237.
- Cracowski, J., & Durand, T. (2002). Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans : physiology , pharmacology and clinical implications. *Trends in Pharmacological Science*, 23(8), 360–366.
- Csala, M., Kardon, T., Legeza, B., Lizák, B., Mandl, J., Margittai, É., & Puskás, F. (2015). On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(5), 826–838. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.01.015>
- Czerska, M., Zieliński, M., & Gromadzińska, J. (2016). ISOPROSTANES – A NOVEL MAJOR GROUP OF OXIDATIVE STRESS MARKERS. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 29(2), 179–190.
- Dąbrowska, M., Zielińska, A., & Nowak, I. (2015). science Lipid oxidation products as a potential health and analytical problem. *Faculty of Chemistry*, 69(2), 89–94.
- Dąbrowska, N., & Wiczowski, A. (2017). Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage Lipid peroxidation. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(1), 155–166. <http://doi.org/10.17219/acem/43272>

- Dahl, J. H., & Breemen, R. B. (2010). Rapid Quatitative Analysis of 8-iso-PGF2 Using Liquid Chromatografy-Tandem Mass Spectrometry and Comparison to an Enzyme Immunoassay Method. *Analytical Biochemistry*, 404(2), 211–216. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2010.05.023>.Rapid
- Dalle-donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4), 169–176. [http://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00031-5](http://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00031-5)
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52(4), 601–23. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>
- Debnath, M., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2010). *Mocelular Diagnostics: Promises and Possibilities*. London. <http://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4>
- Decaprio, A. P. (1997). Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment. *Environmental Science & Technology*, 31(7), 1837–1848. <http://doi.org/10.1021/es960920a>
- DeCaprio, A. P. (1997). Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment. *Environmental Science & Technology*, 31(7), 1837–1848. <http://doi.org/10.1021/es960920a>
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316–328. <http://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
- Devasagayam, T. P. A., Bloor, K. K., & Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation : An analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 40, 300–308.
- Dews, I. (2010). Biomarkers are not new. In M. R. Bleavins, C. Carini, M. Jurima-Romet, & R. Rahbari (Eds.), *Biomarkers In Drug Development - A Handbook of Practice, Aplication, and Strategy* (1st ed., pp. 3–14). New Jersey: Jonh Wiley & Sons.

- Domenico, F. D., Coccia, R., Butterfield, D. A., & Perluigi, M. (2011). Biochimica et Biophysica Acta Circulating biomarkers of protein oxidation for Alzheimer disease: Expectations within limits. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814, 1785–1795. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.001>
- Dunlop, R. A., Brunk, U. T., & Rodgers, K. J. (2009). Critical Review Oxidized Proteins: Mechanisms of Removal and Consequences of Accumulation. *IUBMB Life*, 61, 522–527. <http://doi.org/10.1002/iub.189>
- Dwivedi, G., & Dwivedi, S. (2007). Sushruta – the Clinician – Teacher par Excellence. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, 49, 1982–1983.
- El-Bahr, S. M. (2013). Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. *Science International*, 1(5), 111–117. <http://doi.org/10.5567/sciintl.2013.111.117>
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Wahab, M. S. A. (2013). Evidence in Support of Potential Applications of Lipid Peroxidation Products in Cancer Treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 8.
- Erzsébet, F., Dumitru, C. M., Ibolya, F., & Daniela-lucia, M. (2015). Is the Oxidative Stress Really a Disease? *Acta Medica Marisiensis*, 9. <http://doi.org/10.1515/amma-2015-0070>
- Esterbauer, H., Schaur, R., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81–128. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](http://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
- Faroon, O., Roney, N., Taylor, J., Ashizawa, A., Lumpkin, M. H., & Plewark, D. J. (2008). Acrolein health effects. *Toxicology and Industrial Health*, 24, 447–490.
- Fathi, E., & Mesbah-namin, S. A. (2014). Biomarkers in Medicine: An Overview. *British Journal of Medicine & Medical Reasearch*, 4(8), 1701–1718.
- FDA. (2006). *Critical Path Opportunities Report*. Retrieved from [http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/reports/opp\\_report.pdf](http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/reports/opp_report.pdf)

- Feng, Z., Hu, W., Marnett, L. J., & Tang, M. (2006). Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 601(1–2), 125–136. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.06.003>
- Ferguson, M. A., & Vaidya, V. (2010). Biomarkers: An evolutionary perspective. In V. Vaidya & J. Bonventre (Eds.), *Biomarkers In medicine, Drug Discovery, and Environmental Health* (1st ed., pp. 1–4). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Firestein, G. S. (2006). A biomarker by any other name .... *Nature Clinical Practice*, 2(12), 2006. <http://doi.org/10.1038/ncprheum0347>
- França, B. K., Alves, M. R. M., Souto, F. M. S., Tiziane, L., Boaventura, R. F., Guimarães, A., & Jr, A. A. (2013). Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *Jornal Português de Gastrenterologia*, 20(5), 199–206. <http://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>
- Frangogiannis, N. G. (2012). Biomarkers: Hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice. *Translational Research*, 159(4), 197–204. <http://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.023>
- Frank, R., & Hargreaves, R. (2003). Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(7), 566–580. <http://doi.org/10.1038/nrd1130>
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., ... Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14), 1144–1170. <http://doi.org/10.1089/ars.2015.6317>
- Giustarini, D., & Dalle-donne, I. (2009). Oxidative stress and human disease: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 46(5–6), 241–281. <http://doi.org/10.3109/10408360903142326>

- Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., ... Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*, 32(1), 169–174. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100032>
- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., ... Uchida, K. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research*, 44(October), 1098–1124. <http://doi.org/10.3109/10715762.2010.498477>
- Gulumian, M., Borm, P. J. A., Vallyathan, V., Castranova, V., Donaldson, K., Nelson, G., ... Africa, S. (2006). Mechanistically identified suitable biomarkers of exposure, effect, and susceptibility for silicosis and coal-worker's pneumoconiosis: a comprehensive review. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 9, 357–395. <http://doi.org/10.1080/15287390500196537>
- Hagen, T. J. (2012). Recent Trends in Biomarker Research and Development. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1(4), 1–3. <http://doi.org/10.4172/2161-1009.1000e108>
- Halder, S. R., & Bhattacharyya, M. (2014). Oxidative stress: Lipid peroxidation products as predictors in disease progression. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 4(3), 151–164. <http://doi.org/10.5455/jeim.210414.rw.007>
- Halliwell, B., & Lee, C. Y. J. (2010). Using Isoprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress: Some Rarely Considered Issues. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(2), 145–156.
- Ho, E., Galougahi, K. K., Liu, C., Bhindi, R., & Figtree, G. A. (2013). Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 1(1), 483–491. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>
- Höhn, A., König, J., & Grune, T. (2013). ScienceDirect Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of Proteomics*, 92, 132–159. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.004>

- Hunter, D. J., Losina, E., Guermazi, A., Burstein, D., Lassere, M. N., & Kraus, V. (2010). A pathway and approach to biomarker validation and qualification for osteoarthritis clinical trials. *Current Drug Targets*, *11*(5), 536–545. <http://doi.org/10.2174/138945010791011947>
- Il'yasova, D., Scarbrough, P., & Spasojevic, I. (2012). Urinary Biomarkers of Oxidative Status. *Clinica Chimica Acta*, *413*, 1446–1453. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2012.06.012>.Urinary
- INCHEEM. (s.d.). Biomarkers and risk Assessment: Concepts and Principles. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>
- Jain, K. K. (2010). *The Handbook of Biomarkers* (1st ed.). Basel - Switzerland: Humana Press. <http://doi.org/10.1007/978-1-60761-685-6>
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, *9*(6), 515–540. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](http://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2)
- Janicka, M., Kot-Wasik, A., Kot, J., & Namiesnik, J. (2010). Isoprostanes-Biomarkers of Lipid Peroxidation : Their Utility in Evaluating Oxidative Stress and Analysis. *International Journal of Molecular Science*, *11*, 4631–4659. <http://doi.org/10.3390/ijms11114631>
- Karatas, F., Karatepe, M., & Baysar, A. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, *311*(1), 76–79. [http://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00387-1](http://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00387-1)
- Karley, D., Gupta, D., & Tiwari, A. (2011). Biomarkers: The Future of Medical Science to Detect Cancer. *Molecular Biomarkers & Diagnosis*, *2*(5), 7. <http://doi.org/10.4172/2155-9929.1000118>
- Kehrer, J. P., & Biswal, S. S. (2000). The Molecular Effects of Acrolein. *Toxicological Science*, *57*, 6–15.
- Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., & Jouyban, A. (2015). Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts*, *5*(3), 123–127. <http://doi.org/10.15171/bi.2015.20>

- Kolb, N. S., Hunsaker, L. A., & Jagt, D. L. V. (1994). Aldose reductase - catalyzed reduction of acrolein: implications in cyclophosphamide. *Molecular Pharmacology*, 45(4), 797–801.
- Kooter, I. (2004). *Inventory of biomarkers for oxidative stress*. Bilthoven.
- Kwolek-Mirek, M., Bednarska, S., Bartosz, G., & Bilinski, T. (2009). Acrolein toxicity involves oxidative stress caused by glutathione depletion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 363–378. <http://doi.org/10.1007/s10565-008-9090-x>
- Li, H., Wang, J., Kaphalia, B. S., Ansari, G. A. S., & Khan, M. F. (2004). Quantitation of acrolein–protein adducts: potential biomarker of acrolein exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 67, 513–524. <http://doi.org/10.1080/15287390490276539>
- Lima, É. S., Saes, D., & Abdalla, P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37(3), 293–303.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <http://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lock, E. A., & Bonventre, J. V. (2008). Biomarkers in translation; past, present and future. *Toxicology*, 245(3), 163–6. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2007.12.004>
- Loft, S., Danielsen, P. H., Mikkelsen, L., Risom, L., Forchhammer, L., & Møller, P. (2008). Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochemical Society Transactions*, 36(5), 1071–1076. <http://doi.org/10.1042/BST0361071>
- Lushchak, V., & Semchyshyn, H. M. (2012). *OXIDATIVE STRESS – MOLECULAR MECHANISMS AND BIOLOGICAL EFFECTS*. (V. Lushchak & H. M. Semchyshyn, Eds.). Croatia.
- Lykkesfeldt, J. (2007). Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*, 380(1–2), 50–58. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2007.01.028>

- Maiese, K. (2009). Marking the onset of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2.
- Marrocco, I., Altieri, F., & Peluso, I. (2017). Review Article Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 32.
- Mayeux, R. (2004). Biomarkers : Potential Uses and Limitations. *The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics*, 1, 182–188.
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 108(8), 652–659. [http://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00412-5](http://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00412-5)
- Milne, G. L. (2017). Classifying oxidative stress by F2 -Isoprostane levels in human disease : The re-imagining of a biomarker. *Redox Biology*, 12(April), 897–898. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.028>
- Min, B., & Ahn, D. U. (2005). Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. *Food Science and Biotechnology*, 14(1), 152–163.
- Moghe, A., Ghare, S., Lamoreau, B., Mohammad, M., Barve, S., McClain, C., & Joshi-barve, S. (2015). Molecular Mechanisms of Acrolein Toxicity: Relevance to Human Disease. *Society of Toxicology*, 143(2), 242–255. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfu233>
- Mol, M., Regazzoni, L., Altomare, A., Degani, G., Carini, M., & Vistoli, G. (2017). Enzymatic and non-enzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal : Methodological aspects and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 17. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.036>
- Montuschi, P., Barnes, P., & Roberts, L. J. (2004). Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB Journal*, 18(15), 1791–1800. <http://doi.org/10.1096/fj.04-2330rev>

- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., & Roberts, L. J. (1990). A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 9383–9387.
- Musiek, E. S., & Morrow, J. D. (2005). F<sub>2</sub>-Isoprostanes as Markers of Oxidant Stress : An Overview. *Current Protocols in Toxicology*, 1–10.
- Naskaski, J. W., & Bartsosz, G. (2001). OXIDATIVE MODIFICATIONS OF PROTEIN STRUCTURES. *Avances in Clinical Chemistry*, 35, 161–253.
- Navarro-Medina, R., Mercado-Pichardo, E., Hernández-Pérez, O., & Hicks, J. (1999). Identification of acrolein from the ozone oxidation of unsaturated fatty acids. *Human & Experimental Toxicology*, (5), 677–682.
- Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E., & Marnett, L. J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31426–31433. <http://doi.org/10.1074/jbc.M212549200>
- Niki, E. (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(2), 809–817. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.020>
- Niki, E., & Yoshida, Y. (2005). Biomarkers for oxidative stress: measurement, validation, and application. *The Journal of Medical Investigation*, 52, 228–230.
- Ogino, K., & Wang, D. (2007). Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Medica Okayama*, 61(4), 181–189. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726507>
- Osawa, C. C., Felício, P. E., & Gonçalves, L. A. G. (2005). Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova*, 28(4), 655–663. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422005000400019>
- Palmer, S. S., & Barnhart, K. T. (2013). Biomarkers in reproductive medicine: The promise, and can it be fulfilled? In *Fertility and Sterility* (Vol. 99, pp. 954–962). <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.019>

- Palmieri, B., & Sblendorio, V. (2007). Oxidative stress tests : overview on reliability and use Part I. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 11, 309–342.
- Patton, S., & Kurtz, G. W. (1951). 2-Thiobarbituric Acid as a Reagent for Detecting Milk Fat Oxidation. *Journal of Dairy Science*, 34(7), 669–674. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(51\)91763-8](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(51)91763-8)
- Phaniendra, A., & Babu, D. (2015). Free Radicals : Properties , Sources , Targets , and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <http://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pizzimenti, S., Ciamporcerro, E., Daga, M., Pettazzoni, P., & Arcaro, A. (2013). Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Frontiers in Physiology*, 4(September), 1–17. <http://doi.org/10.3389/fphys.2013.00242>
- Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the Balance between ROS and Antioxidants : When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 11. <http://doi.org/10.1155/2013/956792>
- Pruchniak, M. P., Arazna, M., & Demkow, U. (2015). Does Health Status Influence Acceptance of Illness in Patients with Chronic Respiratory Diseases? *Advances in Experimental Medicine and Biology - Neuroscience and Respiration.*, 6(October 2014), 57–66. <http://doi.org/10.1007/5584>
- Pubchem. (s.d.). 4-Hydroxynonenal. *National Center for Biotechnology Information, U.S.* Retirado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5283344#section=Information-Sources>
- Pubchem. (s.d.). 5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridine. *National Center for Biotechnology Information, U.S.* Retirado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Hydroxythymidine#section=Top>

- Pubchem. (s.d.). 8-epi-PGF2alpha. *National Center for Biotechnology Information, U.S.*  
Retirado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282263#section=Top>
- Pubchem. (s.d.). 8-Oxo-dG. *National Center for Biotechnology Information, U.S.*  
Retirado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73318#section=Top>
- Pubchem. (s.d.). Acrolein. *National Center for Biotechnology Information, U.S.*  
Retirado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7847>
- Pubchem. (s.d.). Malondialdehyde. *National Center for Biotechnology Information, U.S.* Retirado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10964>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, 2014, 19. <http://doi.org/10.1155/2014/761264>
- RHO, J. H., Bauman, A. J., & Boettger, H. G. (1973). A search for porphyrin biomarkers in nonesuch shale and extraterrestrial samples. *Space Life Sciences*, 4, 69–77.
- Roberts, L. J., & Milne, G. L. (2009). Isoprostanes. *The Journal of Lipid Research*, 50, 219–223. <http://doi.org/10.1194/jlr.R800037-JLR200>
- Ryan, T. P., Watson, D. E., & Berridge, B. R. (2004). *Toxicology Biomarkers in Drug Development*. (M. R. Bleavins, C. Carini, M. Jurima-Romet, & R. Rahbari, Eds.) *Jonh Wiley & Sons*.
- Sahu, P., Pinkalwar, N., Dubey, R., Paroha, S., Chatterjee, S., & Chatterjee, T. (2011). Biomarkers: An Emerging Tool for Diagnosis of a Disease and Drug Development. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 9–16.
- Salvaterra, E., Lecchi, L., Giovanelli, S., Butti, B., Bardella, M. T., Bertazzi, P. A., ... Rebullà, P. (2008). *Banking together. EMBO reports* (Vol. 9).
- Santo, A., Zhu, H., & Li, Y. R. (2016). Free Radicals: From Health to Disease. *Reactive Oxygen Species*, 2(4), 28–33.

- Santos-Fandila, A., Camino-Sánchez, F., & Zafra-Gómez, A. (2014). Degradation Markers in Nutritional Products . A Review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 1(1), 1–7.
- Schwarzer, E., Arese, P., & Skorokhod, O. A. (2015). Role of the Lipoperoxidation Product 4-Hydroxynonenal in the Pathogenesis of Severe Malaria Anemia and Malaria Immunodepression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/638416>
- Shah, D., Mahajan, N., Sah, S., Nath, S. K., & Paudyal, B. (2014). Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedical Science*, 21(23), 1–13.
- Shankar, S., & Uday, Y. (2011). Biobanking: Basic concepts and role in rheumatology. *Indian Journal of Rheumatology*, 6(3), 129–137. [http://doi.org/10.1016/S0973-3698\(11\)60075-7](http://doi.org/10.1016/S0973-3698(11)60075-7)
- Shestivska, V., Antonowicz, S. S., Dryahina, K., Kubišta, J., Smith, D., & Španěl, P. (2015). Direct detection and quantification of malondialdehyde vapour in humid air using selected ion flow tube mass spectrometry supported by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(11), 1069–1079. <http://doi.org/10.1002/rcm.7198>
- Shi, R., Rickett, T., & Sun, W. (2011). Acrolein-mediated injury in nervous system trauma and diseases. *Molecular Nutrition & Food Journal*, 55, 1320–1331. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201100217>
- Shibata, A., Uemura, M., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2015). Formation of Acrolein in the Autoxidation of Triacylglycerols with Different Fatty Acid Compositions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 10. <http://doi.org/10.1007/s11746-015-2732-2>
- Shoeb, M., Ansari, N. H., Srivastava, S. K., & Ramana, K. V. (2015). 4-hidroxyonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. *Current Medecinal Chemistry*, 21(2), 230–237.

- Silbergeld, E. K., Holmberg, B., Högberg, J., Trump, B. F., Misra, R. R., & Silbergeld, E. K. (n.d.). Directora del capítulo. In *Encoclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (pp. 1–83).
- Singh, M., Kapoor, A., & Bhatnagar, A. (2015). Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-Biological Interactions*, *234*, 261–273. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.028>.Oxidative
- Siwek, M., Sowa-Kućma, M., Dudek, D., Styczeń, K., Szewczyk, B., Kotarska, K., ... Nowak, G. (2013). Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacological Reports*, *65*(6), 1558–1571. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71517-2](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71517-2)
- Skoumalová, A., & Hort, J. (2012). Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(10), 2291–2300. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01585.x>
- Spickett, C. M. (2013). The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biology*, *1*(1), 145–152. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.007>
- Stanicka, J., Landry, W., & Cotter, T. G. (2015). Oxidative Stress Biomarkers and ROS Molecular Probes. In *In Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy* (Vol. 2, pp. 354–374).
- Steppeler, C., Haugen, J. E., Rodbotten, R., & Kirkhus, B. (2016). Formation of Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal, and 4-Hydroxyhexenal during in Vitro Digestion of Cooked Beef, Pork, Chicken, and Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(2), 487–496. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04201>
- Stevens, J. F., & Maier, C. S. (2008). Acrolein: Souces, metabolism, and biomolecular interactions relevants to human health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, *52*(1), 7–25.

- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2011). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <http://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>. What
- Takamatsu, M., Fukase, K., Oka, R., & Kitazume, S. (2016). A Reduction-Based Sensor for Acrolein Conjugates with the Inexpensive Nitrobenzene as an Alternative to Monoclonal Antibody. *Nature Publishing Group*, 1–12. <http://doi.org/10.1038/srep35872>
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., & Ma, N. (2015). Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 193–217. <http://doi.org/10.3390/ijms16010193>
- Timbrell, J. A. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129, 1–12.
- Travers, A., & Muskhelishvili, G. (2015). DNA structure and function. *FEBS Journal*, (June), 17. <http://doi.org/10.1111/febs.13307>
- Trnkova, L., Drsata, J., & Bousava, I. (2015). Review Oxidation as an important factor of protein damage : Implications for Maillard reaction. *Journal of Biosciences*, 40, 419–439. <http://doi.org/10.1007/s12038-015-9523-7>
- Tsikis, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13–30. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Tully, M., Zheng, L., & Shi, R. (2015). Acrolein detection: potential theranostic utility in multiple sclerosis and spinal cord injury. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 14(6), 679–685. <http://doi.org/10.1586/14737175.2014.918849>. Acrolein
- Udupa, R., & Hallikeri, K. (2016). Methods to Detect Deoxyribonucleic Acid Damage. *International Journal of Advanced Health Sciences*, 2(10), 6–11.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

- Vasan, R. S. (2006). Biomarkers of Cardiovascular Disease Molecular Basis and Practical Considerations. *Basic Science for Clinicians*, 2335–2362. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570>
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. F., Manfredini, V., Benfato, M. S., & Kubota, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para a sua determinação. *Quimica Nova*, 30(5), 1323–1338.
- Virgilio, A., Esposito, V., Mayol, L., Giancola, C., Petraccone, L., & Galeone, A. (2015). The oxidative damage to the human telomere: effects of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine on telomeric G-quadruplex structures. *Royal Society of Chemistry*, 9. <http://doi.org/10.1039/c5ob00748h>
- Weber, D., Davies, M. ., & Grune, T. (2015). Determination of protein carbonyls in plasma , cell extracts , tissue homogenates , isolated proteins : Focus on sample preparation and de- rivatization conditions. *Redox Biology*, 5, 367–380. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.005>
- Wilson, S. H., & Suk, W. A. (2002). Biomarkers of Environmentally Associated Disease. In S. H. Wilson & W. A. Suk (Eds.), *Biomarkers of Environmentally Associated Disease: technologies, concepts and perspectives* (1st ed., pp. 3–15). United States of America: Lewis Publishers.
- World Health Organization. (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm#SectionNumber:1.1>
- Yan, L. (2014). Protein Redox Modification as a Cellular Defense Mechanism against Tissue Ischemic Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Lon*, 2014, 12.
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *American Chemical Society*. <http://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yk, L. (2016). Effects of Nanomaterials on Oxidative Stress and Protein Oxidation in Biological System: Biochemical and Biological Aspects Advances in Clinical Toxicology. *Avances in Clinical Toxicology*, 1(1), 10.

- Zelzer, S., Oberreither, R., Bernecker, C., Stelzer, I., Truschnig-Wilders, M., & Fauler, G. (2013). Measurement of total and free malondialdehyde by gas–chromatography mass spectrometry – comparison with high-performance liquid chromatography methology. *Free Radical Research*, 47(8), 651–656. <http://doi.org/10.3109/10715762.2013.812205>
- Zhong, H., & Yin, H. (2015). Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal ( 4-HNE ) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology*, 4, 193–199. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.011>
- Zong, W., Liu, R., Guo, C., & Sun, F. (2011). Novel biomarkers of protein oxidation sites and degrees using horse cytochrome c as the target by mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(5), 1581–1586. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2011.02.004>
- Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., & Vermeulen, N. P. E. (1999). Biomarkers of free radicals damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 202–226.