

RADICAIS LIVRES DO OXIGÉNIO EM MEDICINA (1.^a Parte)

L. M. CUNHA RIBEIRO

Centro de Fisiologia da Hemostase (INIC). Laboratório de Fisiologia Faculdade de Medicina do Porto. Porto

RESUMO

Um radical livre é uma estrutura química que contém um número ímpar de electrões, sendo por isso extremamente instável e muito reactiva. A formação de radicais livres de oxigénio ocorre durante o decurso de processos metabólicos quer fisiológicos quer patológicos. Este trabalho pretende rever de forma sintética mas sistemática alguns conceitos físico-químicos relevantes para a compreensão da bioquímica dos radicais livres, dos mecanismos envolvidos na sua formação, das reacções químicas a que os mesmos dão origem, bem como dos sistemas endógenos de defesa contra esses radicais. Finalmente, aborda-se de forma crítica o papel dos radicais livres de oxigénio na biologia do envelhecimento, na carcinogénese, na lesão de reperfusão e na síndrome de dificuldade respiratória do adulto.

SUMMARY

Oxygen radicals in medicine

Free radicals are highly reactive molecules, and therefore transient, which have an odd number of electrons and are generated *in vivo* as byproducts of normal metabolism. In this review we survey basic concepts on the chemistry of oxygen free radicals, their cellular sources and the reactions they can undergo. We also discuss the cellular defenses against free radicals induced damage. The dysfunction induced by free radicals may thus be a major component of several pathological conditions. The critical role played by free radicals in ageing, carcinogenesis, reperfusion injury and respiratory distress is reviewed.

All respiring organisms are caught in a cruel bind, in that the oxygen which supports their lives is a toxic substance in whose presence they survive only by virtue of an elaborate system of defenses

INTRODUÇÃO

I. Fridovich (1975)*

O oxigénio molecular é imprescindível à existência dos sistemas biológicos aeróbios. Paradoxalmente, exerce nesses mesmos organismos uma toxicidade potencial, que se manifesta sempre que a concentração do oxigénio é superior à normal ou em caso de falência dos sistemas anti-oxidantes.

A toxicidade do oxigénio exerce-se através da formação de radicais livres de oxigénio, estruturas químicas únicas, obtidas por redução parcial do oxigénio, extremamente reactivas e por isso mesmo muito instáveis.

Quando um sistema biológico é exposto à acção de radicais livres algumas das suas moléculas são afectadas. Se a capacidade dos sistemas de defesa anti-oxidantes for ultrapassada pela produção de radicais livres gera-se um estado de stress oxidativo. As consequências biológicas deste processo, vão desde mutações, aberrações cromossómicas e carcinogénese à degenerescência de componentes químicos da célula relacionados com o envelhecimento¹⁻⁴.

A sensibilidade de um organismo ao oxigénio depende de vários factores. Assim, por exemplo, a idade ou a dieta influenciam a capacidade de resistir à acção tóxica do oxigénio. Ratinhos jovens são menos sensíveis à hiperoxia do que os adultos⁵, e uma dieta rica em ácidos gordos polinsaturados ou deficiente em anti-oxidantes como a vitamina E, torna os ratos mais sensíveis à acção deletéria do oxigénio⁶.

No entanto, nos seres vivos a síntese controlada de radicais livres é uma etapa necessária e extremamente útil para o normal desenrolar de processos essenciais como a fagocitose ou a síntese de prostaglandinas e nucleótidos cíclicos⁷.

Em 1954, Rebecca Gershan e Daniel Gilbert sugeriram que os efeitos deletérios do oxigénio seriam devidos à acção de radicais livres de oxigénio⁸.

Desde então, o nosso conhecimento nesta área aumentou consideravelmente e envolve a mais diversa patologia. Por isso, torna-se essencial compreender os mecanismos bioquí-

micos básicos implicados na formação e destruição dos radicais livres e o seu envolvimento em algumas áreas da Medicina. É esse o objectivo desta breve revisão.

NOÇÕES ELEMENTARES DA FÍSICA E QUÍMICA DOS RADICAIS LIVRES

Um radical livre é uma molécula ou parte desta com um ou mais electrões desemparelhados, que simbolicamente se representa por um ponto (R^{\bullet}). Esta definição lata abrange espécies químicas como o átomo de hidrogénio, metais de transição e o oxigénio molecular (dioxigénio), e implica que os radicais livres tanto possam ser electricamente neutros como positivos ou negativos⁹⁻¹⁷.

A formação de um radical livre pode ocorrer pela acção do calor ou energia da radiação ionizante ou electromagnética por clivagem homolítica de uma ligação covalente ($A \bullet \bullet B \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$).

Numa molécula ou átomo, em cada orbital encontram-se dois electrões que de acordo com o princípio de exclusão de Pauli tem spins antiparalelos, ou seja, tem números quânticos de spin diferentes ($+1/2$ e $-1/2$), o que dota a estrutura de relativa estabilidade (Fig. 1). Neste caso, dado que os electrões tem spins opostos, os respectivos momentos magnéticos anulam-se mutuamente. Quando se trata de um radical livre, o momento magnético do electrão solitário não é compensado pelo de um outro electrão pelo que o radical quando submetido a um campo magnético (Fig. 1) tem um momento magnético que é igual ao do seu electrão solitário. As espécies químicas que exibem este efeito dizem-se paramagnéticas, e algumas das técnicas utilizadas para o estudo dos radicais livres (espectrometria de ressonância electrónica de spin (ESR)/ressonância paramagnética electrónica (EPR)) baseiam-se nesse efeito.

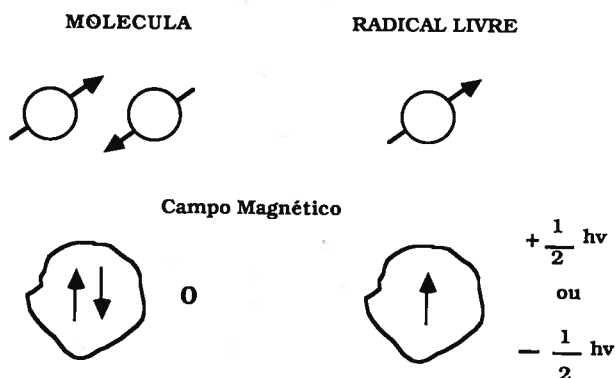
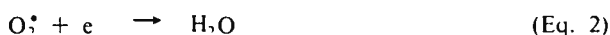


Fig. 1 — Sobre a acção de um campo magnético o electrão solitário do radical livre, ao contrário da molécula, apresenta um momento magnético a que correspondem dois estados energéticos possíveis (+ 1/2 ou - 1/2).

A instabilidade dos radicais livres faz com que estes sejam extremamente reactivos. Se um radical livre reage com uma molécula normal, outro radical livre é produzido, estabelecendo-se um processo de propagação em cadeia, que se não forem os sistemas de defesa ou a possibilidade de reagir com outro radical e assim se eliminarem mutuamente, tenderia a autopropagar-se.

O oxigénio molecular no seu estado fundamental contém dois electrões desemparelhados com o mesmo número quântico de spin, isto é, com spins na mesma direcção (Fig. 2), comportando-se como um radical livre, mais precisamente um biradical. O facto de ambos os electrões terem o mesmo spin limita a capacidade do oxigénio oxidar outras substâncias, já que isso implicaria que a outra substância contivesse dois electrões desemparelhados com spin idêntico por forma a encaixar na molécula de oxigénio. Este condicionamento imposto pela restrição de spin conduz a que a redução completa do oxigénio se processe em etapas, isto é: reage inicialmente com um electrão formando um novo radical livre e só depois reage com outro electrão.



A excitação do oxigénio molecular conduz à absorção de energia por parte deste, tornando-se numa espécie muito instável, o singlete¹⁶, o qual já não está sujeito a restrição de spin (Fig. 2).

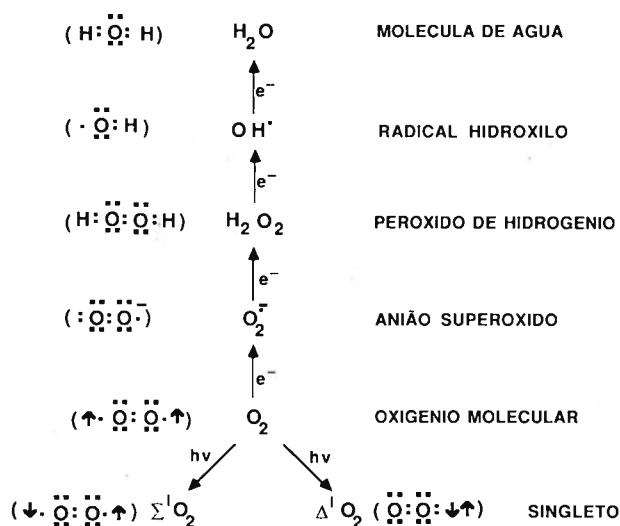
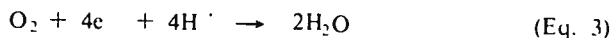


Fig. 2 — Excitação e redução do oxigénio molecular.

RADICAIS LIVRES DO OXIGÉNIO BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

Na membrana interna da mitocôndria o complexo citocromo-oxidase reduz o oxigénio a água através da adição de 4 electrões a cada oxigénio molecular.



No entanto, várias reacções celulares acompanham-se da redução parcial do oxigénio, conduzindo neste caso à geração de radicais livres de oxigénio e outros compostos intermediários.

Por outro lado, a excitação do oxigénio molecular conduz à formação do singlete, o que permite aumentar a reactividade potencial do oxigénio, já que se deixa de verificar a restrição de spin.

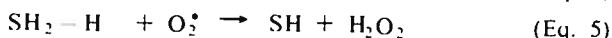
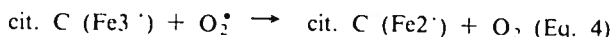
Superóxido

A activação de células fagocitárias, neutrófilos, monócitos e macrófagos, acompanha-se da formação de superóxido. O papel biológico que este desempenha é evidenciado na doença granulomatosa crónica, cujos doentes tem um efeito congénito que não permite a formação de superóxido¹⁸ estando associada a infecções graves e repetidas que se manifestam desde a infância.

Quando o oxigénio aceita um electrão a pH neutro, converte-se no anião superóxido, um radical mais activo do que o oxigénio, pois não tem restrição de spin.

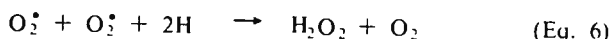
A redução monovalente do oxigénio, em condições tão diferentes como a fagocitose¹⁹, a auto-oxidação de catecolaminas²⁰ a acção da enzima xantina-oxidase²¹ ou citocromo P-450 reductase²² ou o transporte de oxigénio pela hemoglobina²³, conduz à formação de superóxido. Também a radiação ultravioleta e ionizante²⁴ bem como certos compostos como o paraquat²⁵, a adriamicina²⁶ ou o aloxano²⁷, são potenciais fontes geradoras de superóxido.

O superóxido pode actuar como um redutor, cedendo o seu electrão e convertendo-se em oxigénio (eq. 4) ou como um oxidante, sofrendo redução para peróxido de hidrogénio (eq. 5).



No entanto, a sua capacidade oxidante é muito reduzida só se verificando na presença de compostos que possam ceder H⁺ como o catecol ou o α-tocoferol (vit. E). Assim, a sua actuação fundamental é a de reduzir substâncias (eq. 4)^{28,29}.

Em solução aquosa o superóxido sofre dismutação segundo a seguinte reacção:



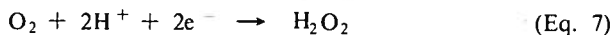
Esta pode ser espontânea ou catalizada pela enzima superóxido dismutase. A dismutação espontânea é mais rápida a pH 4.8. A pH neutro ou alcalino é praticamente inexistente devido à repulsão electrostática que impede a aproximação dos dois aniões. A superóxido dismutase exerce a sua actividade numa larga faixa de pH permitindo a remoção rápida e eficaz do superóxido.

Sendo o superóxido o único substrato da superóxido dismutase, e revelando esta um efeito protector em organismos sujeitos a stress oxidativo^{30,31}, a teoria de que a acção tóxica do oxigénio se exerce através do superóxido^{3,32,33} recebeu confirmação parcial, se bem que indirecta. Porém, em certos casos a presença de superóxido dismutase não é suficiente

para evitar o efeito tóxico do superóxido, o que levou a sugerir que o superóxido pode gerar outros radicais livres e através destes exercer parte da sua acção deletéria^{34,35}.

Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio (hidroperóxido) é o mais estável dos produtos intermediários da redução do oxigénio. Como não tem nenhum electrão desemparelhado não é um radical livre. Forma-se ou através da dismutação do superóxido, sendo neste caso um produto da acção da superóxido dismutase (eq. 6), ou por redução bivalente do oxigénio molecular. Neste caso a reacção é catalizada por oxidases³⁶ que se encontram nos peroxisomas, e que transferem dois electrões para o oxigénio.

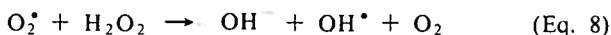


Embora altas concentrações de peróxido de hidrogénio sejam capazes de matar a maioria das células^{30,37,38}, o peróxido de hidrogénio puro é muito pouco reactivo e por isso difunde-se facilmente através da célula³⁹. Porém, na presença de certos metais decompõe-se rapidamente para dar origem ao radical hidroxilo²⁹, que como veremos adiante é altamente tóxico.

Radical Hidroxilo

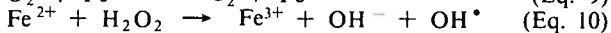
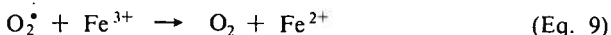
O hidroxilo (hidroxilo^{*}) é um radical livre altamente oxidante, com uma semivida da ordem dos nanosegundos e que reage de imediato com as moléculas vizinhas, produzindo radicais secundários e iniciando a propagação de reacções em cadeia⁴⁰⁻⁴². A toxicidade do hidroxilo está aumentada pela ausência de sistemas específicos da sua destruição (*scavengers*)⁹.

A formação de hidroxilo requer a presença de peróxido de hidrogénio e superóxido pelo que de início se pensou que os mesmos reagiriam directamente para formar o radical hidroxilo.



Porém, esta reacção, conhecida por reacção de Haber-Weiss (eq. 8)⁴³, não só tem uma velocidade próxima de zero, como as diminutas concentrações de superóxido e peróxido de hidrogénio existentes na célula, tornam totalmente improvável que a mesma possa ocorrer^{44,45}. No entanto, a redução de complexos contendo Fe³⁺, forma Fe²⁺ que é um potente catalizador do hidroxilo a partir do peróxido de hidrogénio.

Durante esta reacção, designada por reacção de Fenton (eq. 11)⁴⁶⁻⁴⁸, ou reacção de Haber-Weiss, catalizada pelo ferro, o ferro é inicialmente reduzido pelo superóxido, após o que é oxidado pelo peróxido de hidrogénio.



Como se viu, a reacção de Fenton requer a presença de metais de transição, sendo o ferro especialmente activo. Implicitamente, um determinante importante na toxicidade do superóxido e do peróxido de hidrogénio in vivo é a disponibilidade em ferro dos locais de formação desses compostos⁴⁹.

Agentes redutores, como o ascorbato, podem também reduzir o ferro, o que implica que o peróxido de hidrogénio na presença de metais de transição pode gerar hidroxilo na

ausência de superóxido⁵⁰. Este facto condiciona alguns comportamentos clínicos⁴⁹. Assim, doentes com sobrecarga férica devem evitar consumir suplementos de ácido ascórbico⁵¹, o que, a verificar-se, se pode acompanhar de manifestações patológicas indesejáveis⁵². A um perigo semelhante estão sujeitos doentes com anemia tratados com preparados de ferro endovenoso^{53,54}, já que a rápida saturação da transferrina condiciona o aparecimento de catalizadores plasmáticos de hidroxilo.

A reacção de Fenton ocorre in vitro^{24,55} sendo estimulada por agentes quelantes como o EDTA⁵⁶ e inibida por outros quelantes como a desferroxamina⁵⁷.

Existem indicadores da formação de hidroxilo in vivo³⁴. A formação de hidroxilo foi demonstrada em neutrófilos activados^{55,58,59}, em mitocôndrias incubadas com antimicina A⁶⁰ e em microsomas incubados com NADPH⁶¹.

A demonstração de que em sistemas geradores do superóxido, o manitol, um *scavenger* do hidroxilo, protege contra os efeitos do superóxido e do peróxido de hidrogénio, sistemas esses, aonde a superóxido dismutase e a catalase só tem um efeito protector parcial, é uma demonstração indirecta da formação de hidroxilo in vivo^{9,62}.

Singleto

A absorção de energia pelo oxigénio leva a que um dos seus electrões solitários salte para uma orbital de maior energia ou inverte o seu spin, o que conduz à formação do singleto (¹O₂)⁶³. Dois estados energéticos são possíveis⁶⁴: O ¹Σg⁺O₂ e o ¹ΔgO₂ (o oxigénio molecular no seu estado não excitado é um tripleto e é representado por: ³ΣgO₂) (Fig. 2).

Relativamente ao oxigénio, o ¹Σg⁺O₂ tem uma energia mais elevada do que o ¹ΔgO₂ (37 vs 22 Kcal) e é por isso mais instável, tendo uma semivida bastante mais curta (10⁻¹² a 1⁻¹¹ s vs 2 × 10⁻⁶ s)³⁰.

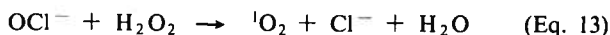
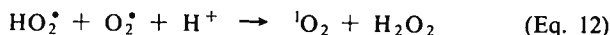
Assim, o ¹Σg⁺O₂ não chega a reagir com qualquer molécula já que decai rapidamente para a forma menos energética, o ¹ΔgO₂. Este não é um radical livre (Fig. 2), tendo uma orbital desocupada, o que o torna fortemente electrofílico reagindo avidamente com moléculas em que se verifique uma alta densidade electrónica (que contenham, por exemplo, ligações duplas carbono-carbono).

Em solução aquosa o ¹ΔgO₂ decai rapidamente para o estado basal. No entanto em ambiente hidrófobo como o interior das membranas a sua semivida está aumentada^{65,66}.

Quando o singleto decai para um nível energético inferior, emite luz, dissipando o excesso de energia, e o seu espectro de emissão está na base de alguns dos métodos que permitem avaliar a formação e importância do singleto em processos biológicos.

Uma série de compostos destroem o singleto, num processo em que a desactivação se processa sem reacção (*quench*) isto é, durante o processo não são consumidos (oxigenados). Estão neste caso, alguns amino-ácidos e proteínas, as vitaminas A, C e E, alguns fenóis e certos componentes da cadeia mitocondrial de transporte de electrões são entre outros, efectivos desactivadores do singleto^{65,67,68}.

Embora os métodos para detectar o envolvimento do singleto em processos biológicos devam ser considerados com bastante reserva, algumas reacções são capazes de gerar o singleto, havendo certa evidência de que possam ocorrer "in vivo".

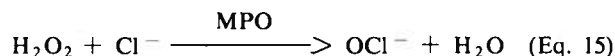


A primeira reacção (eq. 12) é pouco provável que possa ocorrer em sistemas biológicos já que o pKa da ionização do

superóxido é de 4.8 (eq. 14), e assim a pH fisiológico o radical existe quase exclusivamente na forma aniónica (não protónica)²⁹.



Em leucócitos activados, o processo de fagocitose acompanha-se de um consumo súbito de oxigénio com produção de superóxido^{69,70}. A partir deste, o hidroperóxido de hidrogénio e o hidroxilo podem formar-se, participando na destruição das estruturas fagocitadas. Porém, o leucócito, contém a enzima mieloperoxidase (MPO) que a partir do ião cloro e de peróxido de hidrogénio forma hipoclorito (eq. 15) que é um bactericida, cerca de cem vezes mais potente do que o peróxido de hidrogénio⁷¹⁻⁷⁴.



Como durante a fagocitose se observa quimioluminescência⁷⁵ foi sugerido que se formaria singlete (eq. 13) durante este processo, o que a verificar-se seria um importante responsável pela acção microbicida verificada durante a activação leucocitária⁷⁶. Esta hipótese mantém-se por provar.

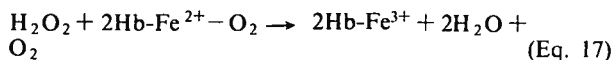
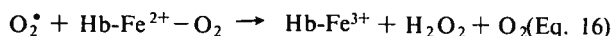
MECANISMOS DA TOXICIDADE DO OXIGÉNIO

Os radicais livres são potenciais causadores de modificações químicas com consequente lesão de vários componentes químicos da célula, nomeadamente ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e glicídios (Fig. 3). Se a formação desses radicais ultrapassar a capacidade endógena de defesa, são de esperar diversas manifestações patológicas.

Devido à forte instabilidade dos radicais livres, a sua actuação é restrita às moléculas vizinhas (a difusão do hidroxilo não ultrapassa os 100 nm¹). Se a formação de radicais se verificar perto de ADN, podem observar-se efeitos mutagénicos e cancerígenos devido a perturbações da desoxiribose e ou das bases nitrogenadas^{77,78}; também a cisão das cadeias do ADN se pode verificar devido à reacção de um radical com o esqueleto fosfato-açúcar^{79,80}.

A susceptibilidade de uma proteína ao ataque por radicais livres, depende não só dos amino-ácidos que a constituem, mas fundamentalmente dos amino-ácidos atacados se encontrarem nas regiões da molécula que lhe conferem actividade. Os amino-ácidos mais sensíveis são os que contêm o grupo tiol (-SH), a cisteína, cistina e metionina, e os aromáticos, fenilalanina, tirosina, histidina e triptofano⁸¹. Também várias proteínas citosólicas podem ser alteradas pela acção dos radicais livres, nomeadamente certas hemoproteínas como a oxihemoglobina⁸² (eq. 16 e 17). Neste caso a reacção

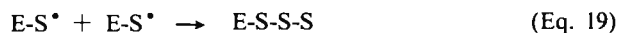
do superóxido ou do peróxido de hidrogénio com a oxihemoglobina leva à formação de metahemoglobina.



De provável relevância clínica, são as alterações que os radicais livres podem provocar no colagénio e no ácido hialurónico. Este último é necessário à manutenção da viscosidade do líquido sinovial, sofrendo despolimerização por acção do superóxido⁸³. O ataque de radicais livres ao colagénio, conduz à formação de radicais de carbono que ao reagirem entre si formam pontes intermoleculares, causando uma diminuição da flexibilidade da molécula⁸⁴.

A ligação covalente de radicais livres a componentes das membranas, altera a sua estrutura, modificando as condições antigénicas e de permeabilidade da membrana⁸⁵.

Muitas das alterações provocadas pelos radicais livres devem-se à oxidação dos grupos tiol (eq. 18), essenciais à actividade de muitas enzimas. Por vezes, a abstracção dum electrão dum grupo tiol segue-se a formação de dímeros (eq. 19) com profunda alteração do comportamento enzimático.



Os efeitos deletérios na retina de altas concentrações de oxigénio devem-se pelo menos em parte, à oxidação do grupo tiol da enzima glicolítica desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato, essencial às necessidades energéticas da retina⁸⁶.

Um dos mecanismos principais pelo qual o oxigénio exerce os seus efeitos indesejáveis é o da peroxidação lipídica⁸⁷. Este processo que está na base da rancidez de gorduras e óleos inicia-se pela abstracção de um hidrogénio (Fig. 4). A camada lipídica das membranas é rica em ácidos gordos polinsaturados. A oxidação destes, envolve a geração de um radical de carbono, o radical peróxido, devido à abstracção de um hidrogénio do esqueleto de hidrocarbonetos (Figs. 4 e 5). A reactividade do radical conduz à geração de um hidroperóxido de lipídeo; este forma-se à custa da abstracção de um hidrogénio lipídico vizinho, iniciando-se assim uma reacção em cadeia, a reacção de propagação. Os hidroperóxidos decompõem-se em aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e numa mistura complexa de hidrocarbonetos. Uns e outros são tóxicos para as membranas alterando a sua fluidez, o transporte iónico e por vezes acarretando mesmo perda de integridade da membrana^{88,90}. A nível do DNA tem

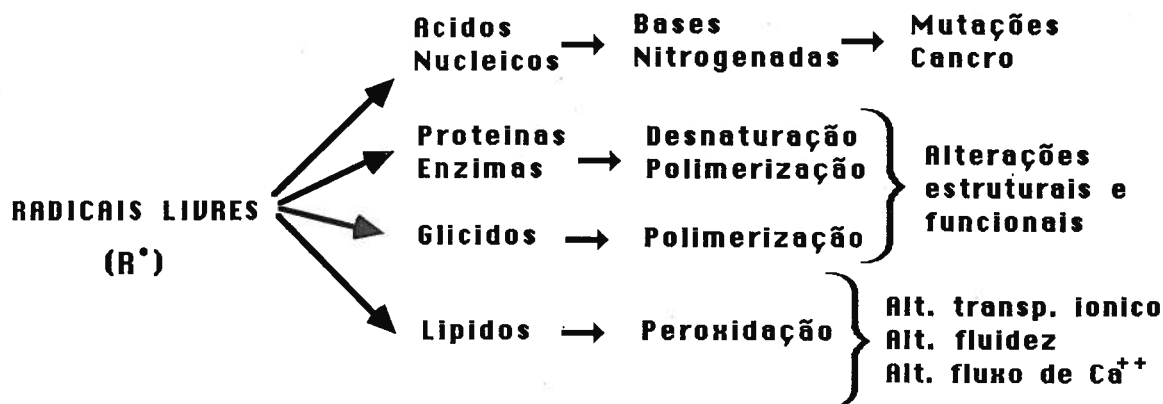


Fig. 3 — Interacção de radicais livres de oxigénio com componentes moleculares da célula, e algumas das perturbações patológicas consequentes.

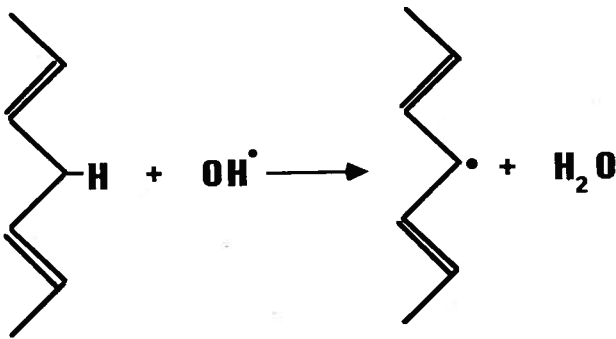


Fig. 4 — Ataque dum ácido gordo polinsaturado por um radical livre, com formação de um radical de carbono por abstracção de um hidrogénio.

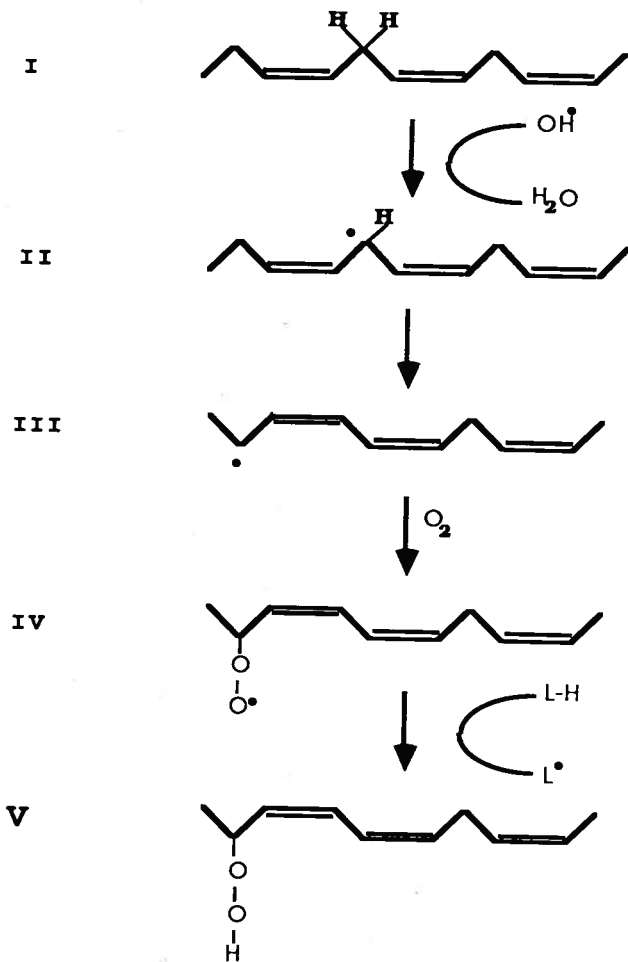


Fig. 5 — Peroxidação Lipídica. I — Ataque de ácido gordo polinsaturado pelo radical hidroxilo com abstracção de um hidrogénio. II — Formação de um radical de carbono. III — Rearranjo da arquitectura molecular do ácido gordo com formação de um dieno conjugado. IV — Formação do radical peróxido após captação de um oxigénio molecular. V — Abstracção de um hidrogénio de outro lípido (L-H), transformando este num radical de carbono (L•), com formação de um hidroperóxido de lípido.

um efeito mutagénico⁹¹. A reacção de iniciação, abstracção do hidrogénio, pode ser desencadeada pelo radical hidroxilo, por isso o peróxido de hidrogénio na presença de metais de transição^{92, 93} (eq. 10) é muito tóxico para as membranas,

dando origem ao processo auto-catalítico da reacção de propagação. Também radiações de vários tipos, poluentes ambientais, oxigénio hiperbárico e ainda uma dieta pobre em anti-oxidantes ou exageradamente rica em ácidos gordos polinsaturados podem desencadear a iniciação da peroxidação lipídica.

Foi sugerido, que durante a decomposição dos hidroperóxidos se poderia formar singlete de oxigénio, o qual por sua vez ao induzir mais peroxidação⁹⁴, iria contribuir para a auto-propagação desta. Contudo, tal hipótese é pouco provável, dado que se baseia em estudos de sistemas experimentais em que a evidência para a existência do singlete, se baseava na utilização de *scavengers* do singlete que do modo algum são específicos deste radical.

Um aspecto particularmente pertinente é se a peroxidação lipídica é a causa da lesão e morte celular ou se pelo contrário é a lesão e morte celular que provocam um aumento da peroxidação lipídica⁸⁷. O facto da lesão celular se acompanhar da inactivação de alguns anti-oxidantes⁹⁵ e da libertação de iões metálicos⁹⁶, torna a última hipótese plausível, pelo menos em certas situações.

MECANISMOS DE DEFESA CONTRA OS RADICAIS LIVRES

A sobrevivência dos organismos aeróbios depende da eficácia de um conjunto de sistemas cuja função é prevenir e destruir os radicais livres de oxigénio impedindo ou minimizando os seus efeitos deletérios (Fig. 6).

ENZIMATICO

- SUPEROXIDO DISMUTASE
- CATALASE
- GLUTATIÃO PEROXIDASE
- OUTRAS (GSSG Reductase, G6PD...)

NÃO ENZIMATICO

- alpha-TOCOFEROL (Vit. E)
- ASCORBATO (Vit. C)
- beta-CAROTENO (Vit. A)
- OUTROS (Ceruloplasmina, ferritina, urato...)

Fig. 6 — Principais mediadores dos mecanismos de defesa dos sistemas biológicos contra a agressão pelos radicais livres.

Embora em situações normais mais de 95% do oxigénio consumido sofra redução tetravalente através da citocromo oxidase com formação de água, certas situações como a deficiente perfusão de um tecido, pode desviar o metabolismo do oxigénio daquela via, com a consequente formação de radicais livres de oxigénio.

A demonstração de que a inibição ou destruição desses mecanismos de defesa, acarreta a morte dos respectivos organismos, revela de forma insofismável tanto a toxicidade desses radicais como o papel crítico dos sistemas de defesa^{97,98}.

Superóxido dismutase

As superóxido dismutases (SOD) são metaloproteínas que catalizam a dismutação do superóxido (eq. 6). A superóxido dismutase foi inicialmente purificada a partir de eritrócitos, tendo a sua actividade sido atribuída a uma proteína já

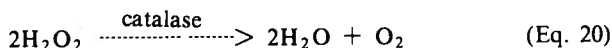
então conhecida, a eritrocupreína⁹⁹. Três tipos de superóxido dismutase foram até hoje encontrados, sendo todas elas absolutamente específicas para o superóxido e contendo metal no centro activo. A superóxido dismutase do citosol de células eucariotas é uma molécula dimerica de 32.500 D, contendo cobre (Cu) e zinco (Zn)¹⁰⁰. O Cu participa na reacção catalítica²⁸ que envolve ciclos alternados de redução e reoxidação do metal, enquanto o Zn parece ter um papel estrutural¹⁰¹, podendo ser substituído por outros metais sem comprometer a actividade catalítica. Em procariotas e nas mitocôndrias de mamíferos, encontra-se uma superóxido dismutase contendo manganésio (Mn)^{102,103}. Embora nas bactérias a enzima seja um dímero e nas mitocôndrias um tetrâmero, existe uma grande homologia na sequência proteica de ambas as enzimas¹⁰⁴. Pelo contrário, a CuZn-SOD não mostra homologia com qualquer outra superóxido dismutase. Finalmente, em certas bactérias e algas, encontra-se uma superóxido dismutase contendo ferro (Fe), que tem uma composição muito semelhante à Mn-SOD¹⁰⁵.

A concentração intracelular em superóxido dismutase é influenciada por muitos factores. Normalmente a sua concentração, é baixa, sendo a síntese da enzima induzida de imediato por um aumento da tensão de oxigénio¹⁰⁶. Também certos compostos, como o paraquat ou a estreptonigrina, que após entrarem na célula iniciam um conjunto de reacções de oxidação-redução estimulam a biossíntese de SOD¹⁰⁷. A redução da cadeia mitocondrial de transporte de electrões, obtida, por exemplo, por acção do cianeto, provoca um aumento imediato da produção de superóxido que se acompanha também de um imediato aumento da biossíntese de SOD¹⁰⁸. Uma dieta pobre em vitamina E, ao promover indirectamente um estado de stress oxidativo é também um estímulo para a biossíntese de SOD¹⁰⁹.

A importância biológica da superóxido dismutase é bem demonstrada pelo facto de que só os organismos anaeróbios a dispensam¹¹⁰, e, como seria de prever, mutantes com defeito na molécula de superóxido dismutase são ultrasensíveis à acção do oxigénio¹¹¹.

Catalase

Presente em praticamente todos os organismos, com excepção dos anaeróbios obrigatórios, a catalase é uma cromo-proteína com um peso molecular de 250.000 D, que contém quatro grupos heme e cataliza a seguinte reacção:



Esta reacção tem uma V_{max} muito grande, o que lhe permite catalisar rapidamente a dissociação de grandes quantidades de peróxido de hidrogénio¹¹². No entanto, dada a baixa afinidade da enzima para o substrato, é quase ineficaz a decompor pequenas concentrações de peróxido^{30,39}. A reacção é complicada do ponto de vista cinético, implicando a interacção de duas moléculas de peróxido com o centro activo da enzima¹¹³.

A catalase localiza-se essencialmente a nível dos peroxisomas, não existindo evidência citoquímica da sua presença no citosol¹¹⁴. A sua importância parece ser reduzida, dado que doentes com um defeito genético que se traduz na síntese de uma enzima instável e com consequentes níveis baixos de actividade de catalase no sangue não mostram nenhum defeito significativo ou alteração grave¹¹⁵.

Sistema do glutatião

As células contêm concentrações milimolares de um tripeptídeo (GLY-CYS-GLU) que contém o grupo tiol (-SH), o glutatião³⁰. Este em conjunto com diversas enzimas e o

NADPH é capaz de reduzir o hidroperóxido de hidrogénio bem como peróxidos orgânicos e outros radicais. Além disso, o glutatião é um importante cofactor de determinadas enzimas como a isomerase dos endoperóxidos de prostaglandina¹¹⁶.

Através do sistema do glutatião a célula está protegida de um excesso de peróxido de hidrogénio. Este sistema (Fig. 7)

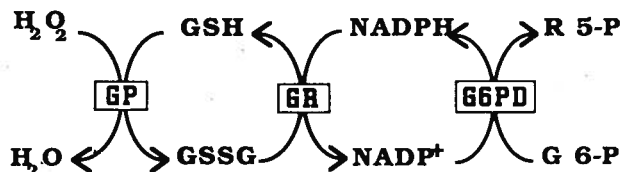
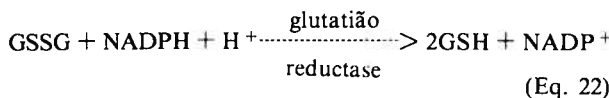
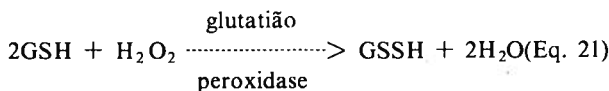
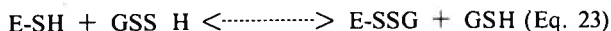


Fig. 7 — Sistemas do glutatião. Para explicação ver texto. Legenda: GP, glutatião peroxidase; GR, glutatião redutase; G6PD, glicose 6 — fosfato desidrogenase; G6P, glicose 6 — fosfato e R5P, ribulose 5 — fosfato.

consiste na oxidação do glutatião reduzido (GSH) por acção da enzima glutatião peroxidase (eq. 21), a que se segue a redução do glutatião oxidado (GSSG) pela enzima glutatião reductase (eq. 22).



A glutatião peroxidase apresenta-se como um tetrâmero de 84000 D em que cada subunidade contém, selénio, sendo este indispensável à actividade da enzima. A glutatião peroxidase coopera com a catalase na metabolização do peróxido de hidrogénio, tendo, por razões de ordem cinética, um papel preferencial na destruição do peróxido de hidrogénio¹¹⁷. No entanto, em situações em que a concentração de peróxido de hidrogénio é muito elevada, a catalase tem um papel preferencial¹¹⁸. A acção cooperativa destas duas enzimas permite evitar uma depleção em GSH, com consequente aumento em GSSH. Em certas situações de stress oxidativo pode verificar-se um aumento de GSSH, o que é extremamente tóxico, já que diversas enzimas (E-SH) podem ser oxidadas com consequente inactivação (E-SHG) (eq. 23); estão neste caso enzimas envolvidas na síntese proteica¹¹⁹ e a adenilciclase¹²⁰, por exemplo.



Para evitar um excesso de GSSH a enzima glutatião reductase desempenha um papel extremamente importante. Esta enzima, que cataliza a reacção 22, encontra-se largamente distribuída nos organismos aeróbios sendo NADPH dependente. O equilíbrio da eq. 22 favorece a redução do GSSH, daí o quociente GSH/GSSH ser em condições normais sempre muito elevado¹²¹. Das reacções 21 e 22 torna-se evidente que uma depleção de GSH provocada por um qualquer stress oxidativo se acompanha de um consumo de NADPH, o que é confirmado pela activação da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase¹²². Esta enzima oxida a glicose 6-fosfato em ácido 6-fosfogluconico, o que se acompanha da redução da coenzima NADP^+ em NADPH, iniciando o shunt das pentoses. Este shunt, que normalmente é responsável por cerca de 10% do metabolismo celular da glicose, permite a manutenção de um pool de NADPH necessário ao funcionamento da glutatião reductase.

Além da redução do peróxido de hidrogénio a glutatião peroxidase, é um importante protector contra a peroxidação

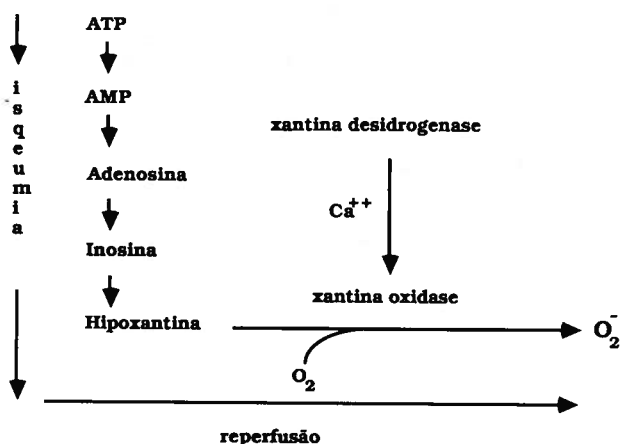
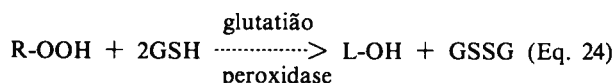


Fig. 8 — A isquemia provoca uma depleção em ATP, com formação dos seus metabolitos, nomeadamente a hipoxantina. A reintrodução de oxigénio durante o período de reperfusão, conduz à formação de superóxido através da acção da oxidase da xantina.

lipídica (eq. 24), reduzindo os peróxidos de lipídeo (ROOH) a compostos estáveis, os hidroxiácidos (ROH).



O papel da actividade da glutatião peroxidase na protecção contra a peroxidação lipídica não se limita à acção da peroxidase já referida e que contém selénio. Em diversos tecidos, incluindo o fígado humano, aquela actividade é desempenhada por uma glutatião peroxidase que não contém selénio^{123,124}. Esta enzima distingue-se da outra por não catalisar a degradação do peróxido de hidrogénio, actuando exclusivamente nos peróxidos orgânicos¹²³.

O papel do selénio no sistema do glutatião não está totalmente esclarecido. O selénio é um elemento essencial^{125,126}, tendo sido identificado como um factor necessário à prevenção da degenerescência necrótica do fígado do rato¹²⁵. Porém, dado que a maior parte do nosso conhecimento sobre o papel biológico do selénio foi obtido em estudos veterinários e de agricultura, deve-se ser bastante cauteloso no ajuizar da sua importância. Um dos poucos casos em que o seu papel é irrefutável é o da doença de Kesham¹²⁷. Esta é uma grave cardiomiopatia endémica em certas partes da China, onde o suporte dietético em selénio é extremamente baixo, e que uma dieta com suplementos em selénio permite evitar¹²⁸. Embora tal não esteja provado, é sugestivo atribuir a uma diminuição da actividade em glutatião peroxidase um papel na fisiopatologia da doença.

Outros

Um vasto conjunto de moléculas colabora com as enzimas acima referidas inibindo a formação ou destruindo diversos radicais livres, ou muito simplesmente protegendo e preservando os sistemas e seus componentes encarregados da protecção contra os radicais.

A vitamina E (α tocoferol) é uma molécula polar que nas membranas biológicas estabelece diversas interacções físico-químicas com os ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos tornando a membrana mais compacta, o que dificulta o acesso de radicais e desencadeadores do processo de peroxidação lipídica^{30,129}. A vit. E é o principal antioxidante hidrófobo que protege as membranas mitocondriais das células musculares¹³⁰. Além disso, a vit. E destrói com eficácia os radicais peróxidos que se formam na membrana durante a peroxidação lipídica, sendo ainda um desactivador do sin-

gletto de oxigénio⁶⁵ e um scavenger do superóxido e do radical hidroxilo^{131,132}. Porém, o papel da vit. E não está totalmente estabelecido, não sendo suficientemente claro se é ou não um componente essencial à dieta do homem³⁰. Ratos e coelhos deficientes em vit. E apresentam um processo degenerativo muscular associado um aumento da peroxidação lipídica e que é revertido pela vit. E⁹⁴. No entanto, embora o papel antioxidante da vit. E esteja bem estabelecido, desconhece-se se a sua acção se limita a este papel¹³³. A situação em que se encontram os nossos conhecimentos sobre a vit. E foi bem sintetizada por Dormandy (1978)¹³⁴: *Within the last thirty years, vitamin E has been hailed as an elixir of life and dismissing as a tonic for tired sheep*.

O ácido ascórbico é um composto polar essencial pelo menos para a vida animal¹³⁵, que se comporta como um scavenger de vários radicais². O cristalino humano é rico em ácido ascórbico e pobre em superóxido dismutase, e a este nível o ascorbato é provavelmente um importante agente na destruição do radical superóxido¹³⁶. Uma das mais importantes funções do ascorbato é manter os tocoferóis na forma reduzida (reduzindo o radical tocoferil em α -tocopherol)¹³⁷.

No entanto, o ascorbato, como já se viu, pode ter uma acção deletéria, na medida em que pode reduzir o ferro, o que conduz à formação de radical hidroxilo (eq. 10)⁵⁰.

O β -caroteno tal como o α -tocopherol é um composto hidrófobo que no interior das membranas além de impedir a peroxidação lipídica funciona como um scavenger do singletto¹³⁸. Também o ácido ascórbico e o GSH são rapidamente oxidados pelo singletto⁶⁸, impedindo a acção deste. O ácido úrico protege os eritrócitos da peroxidação lipídica, destruindo alguns dos radicais que iniciam o processo de peroxidação¹³⁹. Além do ácido ascórbico e do GSH outras moléculas comportam-se como anti-oxidantes; é o caso da cisteína e da ceruloplasmina. Esta última, além de catalizar a oxidação do Fe²⁺ em Fe³⁺, colaborando assim na defesa contra a peroxidação lipídica (eq. 10)¹⁴⁰, actua no superóxido destruindo-o, se bem que numa base estequiométrica e, portanto, não enzimática^{2,30}. Finalmente, algumas proteínas como a ferritina e a transferrina ao ligarem-se ao ferro removem-no de lugares em que aquele poderia participar nas reacções de iniciação de processos de peroxidação¹⁴¹.

BIBLIOGRAFIA

1. SLATER T.V. — Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.
2. FREEMAN B.A., CRAPO J.D. — Biology of Disease. Free Radicals and Tissue Injury. *Labor Invest* 1982; 47: 412-426.
3. FRIDOVICH I. — Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23: 239-257.
4. OBERLEY L.W., BUETTNER G.R. — Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* 1979; 39: 1141.
5. BONIKOS D.S., BENSCH K.G., NORTHWAY W.H.J.r. — Oxygen toxicity in the newborn. The effect of chronic continuous 100 percent oxygen exposure on the lungs of newborn mice. *Am J Pathol* 1976; 85: 623.
6. KEHRER P.H., AUTOR A.P. — The effect of dietary fatty acids on the composition of adult rat lung lipids: relationship to oxygen toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 44: 423.
7. MARNETT L.J., DIX T.A., SIEDLIK P.H. et al. — Hydroperoxide Metabolism and Oxidant Generation in Platelets. in: Longenecker GL (ed), *The Platelets. Physiology and Pharmacology*, Academic Press, 1985; pp 187-200.
8. GERSCHAM R., GILBERT D.L., NYE D.L. et al. — Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954; 119: 623.
9. HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. — Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.

10. AUST S.D., MOREHOUSE L.A., THOMAS G.E. — Role of metals in oxygen radicals reactions. *J Free Radicals in Biol Med* 1985; 1: 3-11.
11. WILLSON RADICAL LIVRE — Organic peroxy free radicals as ultimate agents in oxygen toxicity. in: Sies H (ed), *Oxidative Stress*, Academic Press 1985; pp 41-72.
12. NAQUI A., CHANCE B., CADENAS E. et al. — Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 137-166.
13. JANNIESON D., CHANCE B., CADENAS E., et al. — The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 703-719.
14. DORMANDY T.L. — Free radicals reactions in biological systems. *Ann Roy Coll Surg* 1980; 62: 183-193.
15. BORS W., SARAN M., LENGFELDER E., et al. — Detection of oxygen radicals in biological reactions. *Photochem Photobiol* 1978; 28: 629-638.
16. CLOUGH RADICAIS LIVRES, YEE B.G., FOOTE C.S. — Chemistry of singlet oxygen. The unstable primary product of tocopherol photo-oxidation. *J Am Chem Soc* 1979; 101: 683-686.
17. DORMANDY T.L. — An Approach to free radicals. *Lancet* 1983; ii: 1010-1014.
18. TAUBER A.I., BORREGARD N., SIMONS E, et al. — Chronic granulomatous disease: a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine* 1983; 62: 286-309.
19. BABIOR B.M., KIPNES R.S., CURNUTTE J.T. — Biological defense mechanisms: the production by leucocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973; 52: 741-744.
20. MISRA P.H., FRIDOVICH I. — The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170.
21. ROY R.S. — Role of xantine oxidase in superoxide-mediated ischemic injury. in: Alabama, University of South Alabama, PhD Dissertation, 1984.
22. BOSTERLING B., TRUDELL J.R. — Spin trap evidence for production of superoxide radical anions by purified NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 98: 569.
23. LYNCH R.E., LEE G.R., CARTWRIGHT G.E. — Inhibition by superoxide dismutase of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. *J Biol Chem* 1976; 251: 1015.
24. McCORMIK J.P., THOMASON T. — Near-ultraviolet photooxidation of tryptophan. Proof of formation of superoxide ion. *J Am Chem Soc* 1978; 100: 312-313
25. BUS J.S., BIBSON J.E. — Paraquat: Model for oxidant-initiating toxicity. *Environmental Health Perspectives* 1984; 55: 37-46.
26. JACKSON J.A., REEVES J.P., MUNTZ K.H., et al. — Evaluation of free radicals effects and catecholamines alterations in adriamycin cardiotoxicity. *Am J Pathol* 1984; 117: 140-153.
27. GRANKVIST K., MARKLUND S. and TALJEDAL IB- Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes. *Nature* 1981; 294: 158.
28. McCORD J.M., FRIDOVICH I- The biology and pathology of oxygen radicals. *Annals Int Med* 1978; 122-127.
29. KLEBANOFF S.J. - Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Annals Int Med* 1980; 93: 480-489.
30. HALLIWELL, B. - Free Radicals, oxygen toxicity and aging. in: Sohal RS (ed), *Age Pigments*, Elsevier 1981; pp1-62.
31. HALLIWELL B and GUTTERIDGE JMC - Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 1984.
32. FRIDOVICH I - Superoxide Dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975; 44: 147-169.
33. FRIDOVICH I - Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. in: Pryor WA (ed) *Free Radicals in Biology*, vol 1, Academic Press 1976; pp239-277.
34. DIGUISEPPI J. and FRIDOVICH - The toxicology of molecular oxygen. *CRC Crit Rev Toxicol* 1983; 12: 315-342.
35. HALLIWELL B - Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems?. *FEBS Lett* 1978; 96: 238-242.
36. NILSSON R, Pick FM and BRAY RC - EPR studies on reduction of oxygen to superoxide by superoxide by some biochemical systems. *Biochim Biophys Acta* 1969; 192: 145-148.
37. ISMAIL G, SAWYER WD and WEGENER WS - Effects of hydrogen peroxide and superoxide radical on the viability of *Neisseria gonorrhoeae* and related bacteria. *Proc Soc Exp Biol (N.Y.)* 1977; 155: 264-269.
38. JACKETT PS, ABER VR and LOWRIE DB - Virulence and resistance to superoxide: low pH and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol* 1978; 104: 37-45.
39. CHANCE B, SIES H and BOVERIS A - Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
40. HALLIWELL B - Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms. The key role of superoxide dismutase. *Cell Biol Int Repts* 1978; 2: 113-128.
41. FRIDOVICH I - Superoxide and superoxide dismutase. *Adv Inorg Biochem* 1979; 1: 1-40.
42. FRIDOVICH I - Biology of oxygen radicals. *Amer Sci* 1975; 63: 54-59.
43. HABER F and WEISS J - The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc London* 1934; 147: 332-351.
44. HALLIWELL B - Attempt to demonstrate a reaction between superoxide and hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 1976; 72: 8-10.
45. WEINSTEIN J and BIELSKI BHJ - Kinetics of the interaction of HO₂ and O₂ -radicals with hydrogen peroxide. The Haber-Weiss reaction. *J Am Chem Soc* 1979; 101: 58.
46. HALLIWELL B - Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Its role in degradation of hyaluronic acid by a superoxide generating system. *FEBS Lett* 1978; 96: 238-242.
47. WINTERBOURN CC - Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem J* 1979; 182: 625-628.
48. GUTTERIDGE JMC, ROWLEY DA and HALLIWELL B - Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. *Biochem J* 1981; 199: 263.
49. The LANCET - Metal chelation therapy, oxygen radicals, and human disease. *Lancet* 1985; 1: 143-145.
50. WINTERBOURN CC - Comparison of superoxide with other reducing agents in biological production of hydroxyl radicals. *Biochem J*; 182: 625.
51. HALLIWELL B - Ascorbic acid, iron overload and desferrioxamine. *Br Med J* 1982; 285: 296.
52. McLARAN CJ, BETT JHN, NYE JA, et al - Congestive cardiomyopathy and haemochromatosis: rapid progression possibly accelerated by excessive ingestion of ascorbic acid. *Aust NZ J Med* 1982; 12: 187-188.
53. BLAKE DR, WINYARD P, LUNEC J, et al - Cerebral and ocular toxicity induced by desferrioxamine. *Q J Med* 1985; 56: 345-355.
54. McLAREN GD, MUIR WA and KELLEMEYER RW - Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis and therapy. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1983; 19: 205-266.
55. REPINE JE, EATON JW, ANDERS MW, et al - Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals and human phagocytes in vitro. *J Clin Invest* 1979; 64: 1642-1651.

56. McCORD JM and DAY ED Jr - Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. FEBS Lett 1978; 86: 139-142.
57. GUTTERIDGE JM, RICHMOND R and HALLIWELL B - Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by deferoxamine. Biochem J 1979; 184: 469-472.
58. TAUBER AL and BABIOR BM - Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. J Clin Invest 1977; 60: 374.
59. WEISS SJ, RUSTAGI PK and LoBuglio - Human granulocyte generation of hydroxyl radicals. J Exp Med 1978; 147: 316.
60. NOHL H, JORDAN W and HEGNER D - Identification of free hydroxyl radicals in respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitrone DMPO. FEBS Lett 1981; 123: 241.
61. COHEN G and CEDERBAUM AL - Chemical evidence for production of hydroxyl radicals during microsomal electron transfer. Science 1979; 204: 66.
62. DILLARD CJ, KUNERT KJ and TAPPEL AL - Effects of vitamin E, ascorbic acid and mannitol on alloxan-induced lipid peroxidation in rats. Arch biochem 1982; 216: 204.
63. WASSERMAN HH and MURRAY RW (ed): Singlet Oxygen Academic Press (NY), 1979.
64. FOOTE CS - Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. in: Pryor WA (ed), Free Radicals in Biology, vol 1, Academic Press, 1976 pp85-133.
65. FOOTE CS, CLOUGH RL and YEE BG - Photo-oxidation of tocopherols. in: DeDuve C and Hayalsh O (ed), Tocopherol. Oxygen and biomembranes, Elsevier 1978; pp 13-21.
66. SUWA K, KIMURA T and SCHAAP AP - Reactivity of singlet oxygen with cholesterol in a phospholipid matrix - A model for oxidative damage of membranes. Biochem Biophys Res Commun 1977; 75: 785-791.
67. FOOTE CS - Quenching of singlet oxygen. Ann N Y Acad Sci 1970; 171: 139-148.
68. BODANNES RS and CHAN PC - Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. FEBS Lett 1979; 105: 195-196.
69. MARKERT M, GLASS, A and BABIOR BM - Respiratory burst oxidase from human neutrophils: Purification and some properties. Proc Natl Acad Sci Usa 1985; 82: 3144-3148.
70. KORCHAK HM, VIENNE K, RUTHERFORD LE, et al - Neutrophil stimulation: receptor, membrane and metabolic events. Fed Proc 1984; 43: 2749-2754.
71. BABIOR B. - The respiratory burst of phagocytes. J Clin Invest 1984; 73: 599-601.
72. CROSS A.R., PARKINSON J.F. and JONES O.T.G. - Mechanism of the superoxide-producing oxidase of neutrophils. Biochem J 1985; 226: 881-884.
73. KLEBANOFF S.J. - Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. J Bacteriol 1968; 95: 2131-2138.
74. KLEBANOFF S.J. and HAMON C.B. - Role of myeloperoxidase-mediated antimicrobial systems in intact leukocytes. J Reticuloendothelial Soc 1972; 12: 170-196.
75. ALLEN R.C. - STERNHOLM R.L. and STEELE RH evidence for the generation of a electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leucocytes and its participation in bactericidal activity. Biochem Biophys Res Comm 1972; 47: 679-684.
76. KLEBANOFF S.J. - Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. Semin Haematol 1975; 12: 117-142.
77. WARD J.F. - Molecular mechanisms of radiation-induced damage to nucleic acids. Adv Radiat Biol 1977; 5: 181.
78. MOODY C.S. and HASSAN H.M. - Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 2855.
79. QUE B.G., DOWNEY K.M. and SO A.G. - Degradation of deoxyribonucleic acid a 1,10-phenanthroline-copper complex: the role of hydroxyl radicals. Biochemistry 1980; 19: 5987.
80. REPINE J.E., PFENNINGER O.W., TALMAGE D.W., et al. - Dimethylsulfoxide prevents DNA nicking mediated by ionizing radiation or iron/hydrogen peroxide-generated hydroxyl radical. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 1001.
81. PRYOR W.A. - The role of free radicals reaction in biological systems. In: Pryor W.A. (ed), Free Radicals in Biology, vol. 1, Academic Press 1976; pp 1-32.
82. WEISS S.J. - Neutrophil-mediated methemoglobin formation in the erythrocyte. the role of superoxide and hydrogen peroxide. J Biol Chem 1982; 257: 2497.
83. GREEWALD R.A. and MOY W.W. - Effects of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. Arthritis Rheum 1980; 23: 455.
84. GREEWALD R.A. and MOY W.W. - Degradation of cartilage proteoglycans and collagen by superoxide radical. Arthritis Rheum 1976; 19: 799.
85. GIROTTI A.W. - Photodynamic action of protoporphyrin IX on human erythrocytes: crosslinking of membrane proteins. Biochem Biophys Res Commun 1976; 72: 1367.
86. HAUGAARD N. - Cellular mechanisms of oxygen toxicity. Physiol Rev 345; 48: 311.
87. HALLIWELL B. and GUTTERIDGE J.M.C. - Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. Lancet 1984; i: 1396-1397.
88. GUTTERIDGE J.M., LAMPORT P. and DORMANDY T.L. - The antibacterial effect of water-soluble compounds from autoxidising linoleic acid. J Med Microbiol 1976; 9: 105-110.
89. GARDNER H.W. - Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids. A review. J Agric Fd Chem 1979; 27: 220-229.
90. PAULS K.P. and THOMPSON S.E. - In vitro somulation of senescence - related membrane damage by ozone - induced lipid peroxidation. Nature 1980; 283: 504-506.
91. PIETRONIGRO D.D., JONES W.B.G., KALTY K., et al. - Interaction of DNA and liposomes as a model for membrane - mediated DNA damage. Nature 1977; 267: 78-79.
92. SVINGEN B.A., BUEGE J.A., O'NEAL F.O., et al. - The mechanism of NADPH - dependent lipid peroxidation. J Biol Chem 1979; 254: 5892-5899.
93. LAI C.S., GROVER T.A. and PIETTE L.H. - Hydroxyl radical production in a purified NADPH - cytochrome C (P450) reductase system. Arch Biochem 1979; 193: 373-378.
94. DIANZANI M.U. and UGAZIO T. - Lipid peroxidation. in: Slater TF (ed) Biochemical Mechanisms of Liver Injury, Academic Press, 1979; pp 669-707.
95. BARBER A.A. - Mechanisms of lipid peroxide formation in rat tissue homogenates. Radiat Res, 1963; suppl 3: 33-43.
96. McBRIEN D.C.H. and SLATER R.F. (ed) - Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer. 1982; Academic Press.
97. GREGORY E.M. and FRIDOVICH I - Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. J Bacteriol 1973; 114: 1193.
98. FORMAN H.J. and FISHER A.B. - Antioxidants defenses. in: Gilbert D.L. (ed), Oxygen and Living Processes. An Interdisciplinary Approach, Springer-Verlag, 1982; pp 235-265.
99. McCORD J.M. and FRIDOVICH I. - Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte in (haemocuprein). J Biol Chem 1969; 244: 6049-6055.
100. STEINMAN H.M., NAIK V.R., ABERNETHY J.L., et al. - Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Complete amino acid sequence. J Biol Chem 1974; 249: 7326.
101. FORMAN H.J. and FRIDOVICH I. - On the stability of superoxide dismutase. The effects of metals. J Biol Chem 1973; 248: 2645.
102. KEELE B.B., McCORD J.M. and FRIDOVICH I. - Superoxide dismutase from Escherichia coli B; a new manganese-containing enzyme. J Biol Chem 1970; 245: 6176.

103. MARKLUND S. — Purification and characterization of a manganese containing superoxide dismutase from bovine heart mitochondria. *Int J Biochem*, 9: 299.
104. STEINMAN H.M. and HILL R.L. — Sequence homologies among bacterial and mitochondrial superoxide dismutase. — *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 3725.
105. KIRBY T., BLUM J., KHANE I., et al. — Distinguishing between Mn-containing and Fe-containing superoxide dismutase in crude extracts of cells. *Arch Biochem Biophys* 1980; 201: 551.
106. HASSAN H.M. and FRIDOVICH I. — Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* 1977; 129: 1574.
107. HASSAN H.M. and FRIDOVICH I. — Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1978; 252: 8143.
108. HASSAN H.M. and FRIDOVICH I. — Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch Biochem Biophys* 1979; 196: 385.
109. CHEN L.H., THACKER R.R. and CHOW C.K. — Tissue anti-oxidant status and related enzymes in rats with long-term vitamin E deficiency. *Nutr Rep Int* 1980; 22: 873.
110. McCORD J.M., KEEBLE B.B. and FRIDOVICH I. — An enzymatic-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 1024-1027.
111. McCORD J.M., BEAUCHAMP C.O., GOSCIN S., et al. — Superoxide and superoxide dismutase. in: *Oxidases and Related Redox Systems. Proceedings of the 2nd Int Symp*, Memphis, King, TE, Mason HS and Morrison M (ed), University Park Press, 1973; pp 51-76.
112. CHANCE B. — Effect of pH upon the reaction kinetics of the enzyme-substrate compounds of catalase. *J Biol Chem* 1952; 194: 471-481.
113. OSHIMO N., CHANCE B., SIES H. et al. — The role of hydrogen peroxide generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. *Arch Biochem* 1973; 154: 117-131.
114. TOLBERT N.E. — Microbodies-peroxisomes and glyoxysomes. *Ann Rev Plant Physiol* 1971; 22: 45-74.
115. MASTERS C. and HOLMES R. — Peroxisomes. New aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol Rev* 1977; 57: 816-882.
116. CHRIST-HAZELHOF E., and NUGTEREN D.H. — Purification and characterization of prostaglandin endoperoxide D-isomerase. A cytoplasmic, glutathione-requiring enzyme. *Biochem Biophys Acta* 1979; 572: 43-5.
117. COHEN G. and HOCHSTEIN — Glutathione peroxidase: the primary agent of the elimination of H₂O₂ in erythrocytes. *Biochemistry* 1963; 2: 1420.
118. JONES D.P., EKLOW L., THOR H., et al. — Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch Biochem Biophys* 1981; 210: 505.
119. ERNST V., LEVIN D.H. and LONDON I.M. — Inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione. Activation of a protein kinase that phosphorylates the alpha-subunit of eukaryotic initiation factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 4110-4114.
120. BABA A., LEE E., MATSUDA T., et al. — Reversible inhibition of adenylate cyclase activity of rat brain caudate nucleus by oxidized glutathione. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 85: 1204-1210.
121. HALLIWELL B. and FOYER C.H. — Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* 1978; 139: 9-17.
122. FISHER A.B. and BASSET D.J. — Glucose metabolism during exposure in hyperbaric O₂. *Bull Europ Physiopath Resp* 1978; 14: 136p-138p, (Abst).
123. SIES H., BARTOLI G.M., BURK R.F., et al. — Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drug oxidations and in selenium deficiency. *Eur J Biochem* 1978; 89: 113-118.
124. LAWRENCE R.A. and BURK R.F. — Species, tissue and subcellular distribution of the non Se-dependent glutathione peroxidase activity. *J Nutr* 1978; 108: 211-215.
125. SCHWARZ K. and FOLTZ — Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 1957; 79: 3292-3293.
126. SCHWARZ K. — Essentiality and metabolic functions of selenium. *Med Clin North Am* 1976; 60: 745-758.
127. CHEN X., YANG J., CHEN X., et al. — Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol Trace Element Res* 1980; 2: 91-100.
128. DIPLOCK A.T. — Metabolic and functional defects in selenium deficiency. *Phil Trans R Soc London* 1981; B294: 105-117.
129. GIASUDDIN A.S. and DIPLOCK A.T. — The influence of vitamin E and selenium on the growth and plasma membrane permeability of mouse fibroblasts in culture. *Arch Biochem* 1979; 196: 270-280.
130. AIKAWA K.M., QUINTANILHA A.T., de LUMEN B., et al. — Exercise endurance training alters vitamin E tissue levels and red blood cell hemolysis in rodents. *Bioscience Rep* 1984; 4: 253-257.
131. NISHIKIMI M., YAMADA H. and YAGI K. — Oxidation by superoxide of tocopherols dispersed in aqueous media with deoxycholate. *Biochem Biophys Acta* 1980; 627: 101.
132. OZAWA T., HANAKI A., MATSUMOTO S., et al. — Electron spin resonance studies of radicals obtained by the reaction of α -tocopherol and its model compounds with superoxide. *Biochim Biophys Acta* 1978; 531: 72.
133. HOEKSTRA W.H. — Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed Proc* 1975; 34: 2083-2089.
134. DORMANDY T.L. — Free radical oxidation and antioxidants. *Lancet* 1978; i: 647-650.
135. ARRIGONI O., ARRIGONI-LISO R., and Calabrese G. — Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature* 1975; 256: 513-514.
136. VARMA S.D., KAMAR S., and RICHARDS R.D. — Light induced damage to ocular lens cation pump. Prevention by vitamin C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3504-3506.
137. TAPPEL A.L. — Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam Horm.* 1969; 20: 493.
138. KEARNS D.R. — Physical and chemical properties of singlet oxygen. *Chem Rev* 1971; 71: 395.
139. AMES B.W., CATHCART R., SCHWIERS E., et al. — Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-causing aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78: 6858.
140. GUTTERRIDGE J.M. — Caeruloplasmin. A plasma protein, enzyme and anti-oxidant. *Ann Clin Biochem* 1978; 15: 293-296.
141. CRICHTON R.R. — Interaction between iron metabolism and oxygen activation. in: *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage*, CIBA Foundation Symposium vol. 65, Elsevier 1979; pp 57-76.

Pedido de Separatas:
 Dr. Luis Manuel Cunha-Ribeiro
 Laboratório de Fisiologia
 Faculdade de Medicina do Porto
 Hosp. S. João
 4200 PORTO