

## **Radicais Livres e antioxidantes: Mitos e Realidades**

### **I. Introdução**

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente em torno dos radicais livres, devido a algumas evidências de sua participação na patogênese de diversas doenças agudas e crônicas e nos mecanismos do envelhecimento.

Observações experimentais confirmam a possibilidade de radicais livres participarem da patogênese de doenças como a aterosclerose, catarata, alguns tipos de câncer, algumas doenças degenerativas do sistema nervoso lesões agudas de reperfusão após isquemia, mostrando ainda que a utilização de substâncias que possam impedir o aparecimento ou acelerar a inativação desses radicais – os chamados antioxidantes – pode reduzir a intensidade das lesões nas doenças citadas.

A existência dessas informações, geralmente incompletas e ainda não totalmente confirmadas, tem levado à crença de que o uso indiscriminado dos antioxidantes pode prevenir ou minorar as conseqüências das doenças crônicas nas quais se admite a participação dos radicais livres.

Desse modo, doses maciças de substâncias antioxidantes têm sido utilizadas, por longo prazo, sem um conhecimento seguro dos possíveis efeitos adversos, gerando uma situação pouco confortável para os médicos, que ainda esperam por informações mais seguras sobre essas substâncias, seus efeitos colaterais e doses nas quais podem ser utilizadas com segurança.

Causa maior apreensão o fato de realmente existirem evidências sobre a existência de radicais livres e sua ação patogênica e sobre os efeitos benéficos dos antioxidantes, observados principalmente a partir de dados experimentais ou investigações epidemiológicas, muitas ainda controversas ou incompletas e sem confirmação através de métodos incontestáveis de investigação. Criou-se, especialmente através da imprensa leiga, o mito de que radicais livres representam o mais importante fator patogênico nas diversas doenças crônicas e que o uso de antioxidantes pode curar ou pelo menos minorar as lesões nessas doenças.

Alguns propagam mais o mito que existe em torno do assunto com base em fatos ou realidades, incompletos ou não confirmados, e outros tentam desfazer esse mito, negando-o, com base também em fatos ou realidades, da mesma forma incompletos ou não confirmados.

Por essa razão, a divulgação, com algum juízo crítico, dos conhecimentos a respeito do assunto radicais livres e antioxidantes, é a melhor maneira de envolver mais a classe médica no seu estudo, o que possibilitará melhor compreensão e aumento do número de observações esclarecedoras sobre o que de fato é mito e o que é realidade, especialmente quando se discute o uso de antioxidantes como verdadeiros preventivos químicos de doenças crônicas de grande impacto, como a aterosclerose e o câncer.

Neste capítulo serão apresentados os radicais livres, sua geração, seus possíveis efeitos na geração de lesões e, também, os principais aspectos dos antioxidantes e mecanismos de antioxidação, visando a informar sobre o que é fato estabelecido, o que é controvérsia ou o que ainda é um dado incompleto.

## **II. Noções Básicas sobre Radicais Livres e sua Produção e Controle em Tecidos Normais.**

Radicaís livres são radicaís que têm um elétron desemparelhado no orbital mais periférico.<sup>3</sup> Nas moléculas, os átomos apresentam no orbital mais externo dois elétrons emparelhados e, se um deles é cedido, o outro fica desemparelhado e, por essa razão, procurará encontrar um novo par no orbital mais próximo que encontrar.

O radical com elétron desemparelhado é, portanto, ávido para ceder esse elétron para outra molécula, no sentido de estabilizar o seu orbital externo, passando a ser um radical livre.

Nos tecidos, os radicaís livres são geralmente gerados pela transferência de um elétron a partir de um doador; a alta reatividade do radical livre está na facilidade que ele tem para ceder esse elétron e criar um novo radical (iniciando uma reação em cadeia) ou um produto não reativo.

Esses radicaís livres são indicados pela fórmula química completa ou simplificada, seguida de um ponto cheio, indicador de existência do elétron desemparelhado:  $O^{\bullet}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $L00^{\bullet}$  (L=lípide),  $CCl_3^{\bullet}$  etc. ( Fig.2-1)

Radicaís livres formam-se normalmente nas células em conseqüência dos diversos processos de oxidação e em decorrência de adaptações funcionais. Reações químicas nas quais moléculas perdem um elétron, passando-o a um aceptor (oxidação), são indispensáveis aos processos biológicos, especialmente na respiração, na síntese de algumas moléculas e na inativação de outras.

Durante esses processos, radicaís livres são especialmente produzidos a partir do oxigênio e, em algumas células especializadas, como os fagócitos, esses radicaís são utilizados para matar microrganismos.

No organismo, as principais fontes de radicaís livres são:

(a) a mitocôndria, que gera superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e água oxigenada ( $H_2O_2$ ) – elétrons transferidos ao longo da cadeia respiratória, para reduzir o oxigênio formando água, podem escapar e reduzir parcialmente o  $O_2$  a superóxido; este, na presença de íons  $H^+$ , gera água oxigenada, reação fortemente potencializada pela enzima superóxido dismutase (SOD), existente na mitocôndria

(b) a oxidação de ácidos graxos nos peroxissomas e a atividade de diferentes oxidases, como as aminoacidoxidases, monoaminoxidases, xantinoxidase, todas geradoras de superóxido e água oxigenada

(c) a atividade do sistema de enzimas do citocromo P450 no retículo endoplasmático liso, que gera  $O^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$

(d) as células fagocitárias, que geram grande quantidade de radicaís do oxigênio,

(O<sup>-</sup>, OH, O<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na explosão respiratória (por ação de uma oxidase NADPH dependente que age sobre o oxigênio molecular, gerando superóxido) – a partir do superóxido, forma-se a água oxigenada; a partir da água oxigenada, do superóxido e dos íons H, na presença de metais de transição livres (Fe e Cu), em condições de sofrer oxidorredução, forma-se o radical hidroxil; a partir deste admite-se a formação do oxigênio simples (O<sub>1</sub>), fato apenas demonstrado em reações de fotossensibilização. Secundariamente, formam-se os radicais HClO<sub>3</sub> e NO, todos utilizados para matar microrganismos.

A formação de radicais hidroxílicos nos sistemas biológicos normais é questionada, tendo em vista que a disponibilidade de metais de transição (ferro e cobre) em estado de redox é pequena, já que esses metais estão combinados a proteínas, às quais se ligam com grande avidéz (ferritina, transferrina, ceruloplasmina).

A possível existência de ferro disponível em estado redox ativo, ligado a pequenas moléculas, como citrato, ADP ou ATP, é muito questionada. As reações de geração de radicais livres envolvendo os metais de transição só ocorrem quando existe uma real sobrecarga desses elementos, como na hemocromatose ou na doença de Wilson.

Já nos leucócitos, admite-se a possibilidade de geração de radicais hidroxílicos através da utilização de ferro em estado redox ativo disponível por mecanismos ainda não esclarecidos.

Radicais livres podem ser gerados externamente e introduzidos no organismo. A fumaça do cigarro, as fumaças poluidoras, de origem industrial ou de motores a explosão, e alimentos podem conter radicais livres ou substâncias que facilitem a sua geração. As radiações ionizantes e ultravioleta agem nos tecidos, induzindo a formação de radicais livres a partir do oxigênio.

Muitos tóxicos exógenos lesam os tecidos por gerarem radicais livres, como ocorre com o CCl<sub>4</sub> e, admite-se, o etanol, entre outros.

Os radicais livres gerados nas células são potencialmente lesivos. Isto é inquestionavelmente demonstrado pelo uso de radicais livres, pelos fagócitos profissionais, para matar microrganismos e células cancerosas. Portanto, os radicais livres são citotóxicos, se puderem agir livremente sobre os componentes celulares, e produzem alterações intersticiais, se agirem sobre os componentes da matriz extracelular.

Nas células normais o superóxido, isoladamente, tem limitada ação lesiva, devido a sua vida extremamente curta e devido à ação da SOD e à pouca disponibilidade de ferro livre para gerar radical hidroxil; a água oxigenada não é um radical livre, mas é uma fonte de radicais livres do oxigênio, especialmente do radical hidroxil, se houver disponibilidade da ação catalítica dos metais de transição.

O óxido nítrico é um radical que age com mediador de vários efeitos na célula e reage facilmente com o superóxido, gerando peroxinitrito (NOO), o qual se decompõe, originando NO<sub>2</sub> e radical hidroxil, que é potencialmente lesivo; nas células que produzem grande quantidade de óxido nítrico, como as endoteliais, a produção de superóxido deve ser fator importante para o controle dos efeitos dessa substância.

Nos fagócitos, a ação dos radicais livres sobre microrganismos fagocitados é facilitada pelo fato de a membrana do fagolisossoma ser impermeável à

superóxido dismutase e pelo fato de os grânulos descarregarem enzimas que podem gerar radicais livres a partir da oxidação de halogênios e água oxigenada. O íon superóxido, aí abundante e longe da superóxido dismutase, gera outros radicais livres, incluindo hidroxil, e os derivados do óxido nítrico.

Por serem extremamente reatores, os radicais livres vão oxidar ou peroxidar moléculas e, se atingirem as macromoléculas, podem lesá-las de modo irreversível.

Desse modo, macromoléculas como os lípidos insaturados podem ser peroxidados e quebrados, provocando dano arquitetural importante em membranas biológicas. Da mesma forma, proteínas são desnaturadas e perdem a função e bases orgânicas nos ácidos nucleicos, perturbando a informação genética.

Os lípidos insaturados (ácidos graxos insaturados ou moléculas complexas que os contêm) são alvo fácil dos radicais livres. O radical livre desloca o hidrogênio de um átomo de carbono saturado, situado entre duas ligações duplas, originando um carbono com elétron, desemparelhado, ou seja, um radical livre centrado em um carbono (temos agora um lípido com um carbono como radical livre, representado genericamente por  $L\bullet$ ); este reage com o  $O_2$  molecular, formando um radical peróxido  $LOO\bullet$  ( $L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet$ ).

Esse radical lipoperóxido reage com outro lípido, deslocando hidrogênio de um carbono vizinho a uma dupla ligação, recomeçando o processo de peroxidação em outra molécula e, sucessivamente, outras moléculas lipídicas insaturadas serão peroxidadas em cadeia se o processo não for interrompido.

Os radicais lipoperóxido podem formar peróxidos cíclicos, que se quebram ao nível das duplas ligações, originando compostos de menor peso molecular, principalmente aldeídos, como o malondialdeído e o 4-hidróxi-nonenal, os quais se podem difundir e peroxidar outras moléculas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos.

Esses derivados da peroxidação dos lípidos podem ser detectados na circulação eferente de um órgão, servindo como indicador indireto da existência de produção de radicais livres nesse órgão.

É importante lembrar que, nos processos de agressão celular, por causas as mais diversas, há aumento da produção de radicais livres, especialmente por liberação de metais de transição (Fe e Cu) a partir de células mortas ou em sofrimento, representando esse aumento de produção de radicais não a causa mas, sim, a consequência da lesão.

Também o pH mais baixo dos tecidos mortos ou agônicos facilita a formação de radicais peróxido a partir de superóxido e  $H^+$ .

Em condições normais, os radicais livres gerados nos processos celulares são inativados (ou têm sua produção controlada) por substâncias antioxidantes naturalmente existentes nas células.<sup>3,7</sup> Em todos os tecidos (e nos alimentos) existem vários compostos que podem reduzir ou impedir os efeitos danosos dos radicais livres produzidos nos processos normais do metabolismo.

Essas substâncias, conhecidas genericamente como antioxidantes, incluem as vitaminas E e C, os carotenóides, as substâncias com grupamento tiol (a glutatona

é o mais importante), minerais como Zn, Mn, Cu, Se e os flavonóides (derivados benzopirênicos de pequeno peso molecular existentes em grande número de vegetais). Essas substâncias podem agir:

a. Como inibidores de reações que geram radicais livres, como as substâncias quelantes de metais de transição (Fe e Cu), principais catalisadores de reações que geram radicais livres a partir do oxigênio. Cumprem esse papel as proteínas ferritina, transferrina e ceruloplasmina.

b. Como captadores de radicais livres, transferindo o elétron desemparelhado para a sua molécula, como fazem a vitamina E, a vitamina C e os carotenóides, conhecidos genericamente como removedores de RL. A vitamina E e a vitamina C são consumidas nesse processo de remoção de radicais livres: a vitamina E, ao transferir o hidrogênio para um radical LOO•, transforma-se no radical tocoferoxil, o qual reage como outro radical LOO•, originando um complexo tocoferol-LOO, inativo.

Sendo lipossolúvel, a vitamina E é o mais importante interruptor da reação em cadeia de peroxidação de lípidos iniciada por um radical livre. A vitamina C libera átomos de hidrogênio do ácido ascórbico, originando o radical ascorbil e, em seguida, o diidroascorbato, que sofre decomposição; os hidrogênios liberados reagem com o radical peroxil, formando produtos não-reatores. O beta-caroteno, como os carotenóides de modo geral, tem efeito antioxidante por ser excelente captador do radical oxigênio simples e poder inativar radicais peroxil, a eles se acoplando, formando um complexo beta-caroteno-LOO, quando em baixa tensão de oxigênio.

Em ambientes com elevada tensão de oxigênio, o complexo beta-caroteno-LOO origina radicais peroxil, tendo portanto ação pró-oxidante. Existem outros removedores de radicais por processo de doação de hidrogênio a radicais peroxil, como o ácido úrico, a glutathiona reduzida (GSH), a cisteína livre (no grupo dos hidrossolúveis) e o licopeno, a bilirrubina, o 2-hidróxi estrona e o 2-hidroxiestradiol (no grupo dos lipossolúveis).

c. Como catalisadores de reações de neutralização de radicais livres através da reação com outros radicais e geração de compostos não-reativos, como fazem a superóxido dismutase, que transforma o superóxido em oxigênio molecular, as catalases, que demolem a água oxigenada, e as peroxidases, que podem quebrar peróxidos de várias naturezas, inclusive os originados de lípidos. Existem três variedades de superóxido dismutase: a do citosol e a do endotélio, ambas dependentes de Zn e Cu, e a da mitocôndria, dependente do manganês. A catalase, abundante nos peroxissomas, demole a água oxigenada, originando água e oxigênio molecular.

As peroxidases são enzimas capazes de demolir peróxidos, geralmente transferindo um hidrogênio de um doador, geralmente a glutathiona (a glutathiona é um tripeptídeo formado por gli-arg-cis e representado por GSH na forma reduzida e por GSSG na forma oxidada). Assim, as lipo-hidroxi-peróxido-peroxidases podem inativar LOOH, originando do lípido o álcool correspondente e oxidando a glutathiona, conforme a reação:  
$$\text{LOOH} + \text{GSH} \rightarrow \text{LOH (álcool)} + \text{GSSG}.$$

A glutathiona pode ser regenerada por ação de uma glutathiona peroxidase que demole a água oxigenada, reduzindo o GSSG a GSH. Essas peroxidases são enzimas selênio-dependentes, possuindo selênio-cisteína no seus sítios ativos.

A eficiência do sistema de transporte de elétrons, a pouca disponibilidade de metais de transição livres e indução de algumas proteínas de estresse também contribuem para controlar a produção e os efeitos dos radicais livres. A agressão do organismo com agentes indutores de radicais livres induz a síntese de proteínas do estresse (especialmente do grupo de 32 KD) com atividade enzimática, facilitando a geração de moléculas captoras desses radicais.

Esses mecanismos antioxidantes naturais estão em equilíbrio com a produção de radicais livres, ou seja, permitem a sua formação, como é necessário para a atividade metabólica normal, mas impedem os seus efeitos lesivos sobre as estruturas celulares. Se houver um desequilíbrio no sistema – excesso de produção de RL ou decréscimo da atividade antioxidante, o que se denomina genericamente estresse oxidativo –, o equilíbrio se rompe e o efeito lesivo dos radicais livres pode manifestar-se, como demonstram numerosas observações experimentais.

Há demonstrações experimentais de que a redução da capacidade antioxidante nos tecidos favorece o aumento de lesões de diversas naturezas.<sup>13</sup> Em modelos experimentais, a deficiência de micronutrientes antioxidantes (vitaminas E e C, caroteno e metais que participam da síntese de enzimas antioxidantes) aumenta a suscetibilidade dos tecidos a lesões induzidas por peroxidação lipídica mediada por radicais livres. Alguns trabalhos experimentais mostram que a deficiência induzida de vitamina E e de selênio, isoladamente ou em conjunto, aumenta a suscetibilidade dos tecidos à agressão por radicais livres, fato demonstrado por lesões mais extensas, produzidas por ação de quimiotóxicos que agem pela produção de radicais livres, como o CCl<sub>4</sub>, por exemplo.

Nesses animais deficientes, há redução da atividade da glutathiona-peroxidase. No entanto, não se pode afirmar com absoluta segurança que a deficiência de vitamina E ou do selênio seja responsável pela piora das lesões por ter induzido redução da capacidade antioxidante (aumentando o estresse oxidativo), pois se sabe que a vitamina E tem propriedades estabilizantes da membrana citoplasmática, independente de sua ação antioxidante (fato demonstrado em modelos in vitro de agressão a fibras musculares esqueléticas) e o selênio influencia a função tireoidiana, cuja disfunção diminui a viabilidade celular.

Na deficiência induzida experimentalmente em Zn, Cu ou Mn, a questão é mais complexa. Em relação ao Zn, as manifestações clínicas da deficiência aparecem na ausência de qualquer alteração na concentração e na atividade de enzimas zinco-dependentes, como a superóxido dismutase. Algumas observações experimentais mostram que a suplementação dietética com vitamina E eleva os níveis plasmáticos de alfatocoferol, o mesmo ocorrendo com os carotenóides. No entanto, faltam ainda demonstrações de que esses aumentos plasmáticos se acompanham de aumento da capacidade antioxidante dos tecidos.

No caso da aplicação tópica do tocoferol (especialmente na forma de sorbato) na pele, tem sido demonstrado o seu efeito protetor sobre as lesões induzidas pela irradiação UV na pele de camundongos atríquicos e que essa proteção está relacionada com a redução na produção de radicais livres após a irradiação.

Os trabalhos experimentais com suplementação dietética com Zn, Cu ou Mn têm demonstrado a existência de mecanismos homeostáticos muito delicados, controlando o metabolismo desses elementos. Há demonstrações de que a

suplementação dietética leve à redução na absorção e ao aumento da excreção desses metais, fato bem demonstrado em relação ao Zn. Em relação ao selênio, existem algumas evidências experimentais de que a suplementação dietética aumenta os níveis sanguíneos do metal (e a excreção urinária), mas a atividade da glutatona-peroxidase fica inalterada.

Portanto, ainda está por ser provado – acreditamos ser pouco provável – que um aumento na ingestão desses metais em organismos normais leve ao aumento do estado antioxidante dos tecidos.

Os radicais livres são utilizados pelas células como reguladores de processos fisiológicos.<sup>14</sup> Alguns radicais livres são importantes mediadores celulares, como o óxido nítrico, cuja atividade é controlada pela disponibilidade de radical superóxido, que o inativa. Também tem sido demonstrado que o controle da expressão gênica pode depender da atividade de radicais livres.

Genes chamados precoces ou imediatos, como o c-jun, c-fos, c-myc (importantes na proliferação e na diferenciação das células), são rapidamente induzidos em células submetidas à ação de espécies reativas do oxigênio. Fatores de transcrição, como o NFκ-beta e a AP-1 (proteínas que regulam a ativação de genes, como da IL-1, TNF, IL-2, entre outros), são ativados para se ligarem aos sítios reguladores no DNA após sofrerem modificações induzidas por radicais livres, agindo em resíduos de cisteína (grupos sulfidril) daquelas proteínas. Há um crescente número de observações mostrando que mecanismos de oxidorredução são importantes na regulação gênica, especialmente no controle da interação de proteínas reguladoras com o DNA.

Os radicais livres são de difícil avaliação quantitativa in vivo, mas os produtos gerados em consequência de sua ação podem ser dosados e servem como método indireto para avaliar sua produção.<sup>11</sup> Por serem extremamente reativos, os radicais livres têm vida muito curta e dificilmente podem ser detectados in vivo. O único método analítico disponível para avaliar radicais livres diretamente é a espectrometria por ressonância magnética eletrônica, técnica difícil de ser adaptada para detecção dos radicais livres in vivo, mas que pode ser utilizada para avaliá-los em fragmentos de tecidos.

Em modelos experimentais, a espectrometria por ressonância magnética eletrônica pode avaliar radicais produzidos in vivo através da injeção de um produto que captura o radical (captura do spin ou spin trapping) e forma produtos mais estáveis, passíveis de avaliação pela ressonância magnética. Infelizmente, não se conhecem captadores de spin que sejam inócuos e possam ser utilizados no homem.

No máximo, podemos colher amostras de sangue, por exemplo, misturá-las in vitro com o spin-trap e avaliar o produto da adição com radicais livres.

Produtos aromáticos, como o ácido salicílico, reagem com o radical hidroxil, produzindo ácido 2,3-diidroxibenzoico, o qual pode ser avaliado na urina. É um método químico, com princípio semelhante ao do spin-trapping para ressonância magnética, e que pode fornecer dados semiquantitativos sobre a produção de radicais livres.

peroxidação de lípidos pode ser avaliada semiquantitativamente pela medida de seus produtos resultantes. Podem ser medidos por métodos bioquímicos os lipoidroperóxidos, os dienos conjugados (por espectrofotometria), os produtos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBRS, substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico), os aldeídos, especialmente o malondialdeído, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Outros aldeídos derivados da peroxidação de lípidos

podem ser avaliados por métodos ainda muito elaborados e caros para serem utilizados na rotina.

A avaliação dos hidrocarbonetos voláteis (etano e pentano) no ar espirado, originados da decomposição de lípidos por processo de peroxidação, tem sido utilizada também para avaliar a produção de radicais livres em pacientes e animais de laboratório.

A avaliação do dano protéico causado por radicais livres tem sido pouco estudada. A medida de radicais carbonila, derivados do ataque de radicais hidroxil a cadeias laterais de aminoácidos, é um bom indicador de ataque oxidativo às proteínas.

A avaliação de danos produzidos ao DNA pode ser feita pela medida de produtos de peroxidação de bases orgânicas, especialmente após ataque de radical hidroxil. Embora numerosos produtos teoricamente possam ser originados, dois têm sido mais freqüentemente detectados: a timina-glicol e a 8-hidroxiguanina que, excisados da molécula de DNA por enzimas de reparo, são excretados na urina. Todos esses métodos têm o inconveniente de não detectar o local onde os produtos dosados estão sendo produzidos, ou seja, onde os radicais livres estão agindo, o que tem limitado muito as investigações clínicas sobre o assunto.

### **III. Radicais Livres e Lesões Teciduais Agudas.**

Radicaes livres e lesões de reperfusão após isquemia<sup>5</sup>

Várias observações experimentais e algumas observações em pacientes têm mostrado que órgãos isquêmicos e reperfundidos têm a lesão isquêmica agravada pela reperfusão. Embora se discuta a participação de vários fatores, como a sobrecarga súbita de cálcio e o maior aporte de leucócitos, acumulam-se evidências de que o aumento na produção de espécies reativas do oxigênio é o fator mais importante no agravamento da lesão isquêmica após reperfusão.

Há comprovação do aumento da produção de produtos de lipoperoxidação no sangue venoso de órgãos isquêmicos reperfundidos e no sobrenadante do meio de cultura de células submetidas a estresse oxidativo; também se demonstra, em modelos experimentais e em células cultivadas, que a utilização de removedores de radicais livres (antioxidantes) reduz significativamente as lesões na reoxigenação após anoxia.

O mecanismo da produção dos espécimes reativos do oxigênio em tecidos isquêmicos reoxigenados é discutível. Na mitocôndria, a produção de superóxido aumenta quando as concentrações de oxigênio são elevadas ou quando a atividade da cadeia respiratória é reduzida. Ora, na isquemia reduz-se a atividade da cadeia respiratória, e a entrada súbita do oxigênio com a reperfusão pode representar uma aumento relativo desse produto.

Outro mecanismo seria a transformação de xantina desidrogenase em xantina oxidase no tecido isquêmico, devido ao acúmulo de produtos de degradação do ATP. A xantina oxidase, que tem como substratos a hipoxantina e a xantina, gerando ácido úrico, utiliza oxigênio molecular no processo e gera superóxido e água oxigenada. Esse mecanismo é válido para os tecidos onde a atividade de xantina oxidase tem sido demonstrada, o que não ocorre com o miocárdio humano, por exemplo.

A demonstração da participação de radicais livres na lesão por reperfusão tem levado numerosos investigadores a tentar utilizar antioxidantes para

prevenir as complicações decorrentes dessa lesão no coração de pacientes submetidos à circulação extracorpórea ou à angioplastia, mostrando resultados que animam a continuação das investigações.

Radicais livres, antioxidantes e síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS)<sup>17</sup>.

Admite-se que as manifestações da sepse e suas conseqüências, bem como os diversos estados da síndrome do choque, estejam relacionadas à produção de grande quantidade de radicais livres derivados do oxigênio, especialmente pelas células inflamatórias (fagócitos) mobilizadas no processo.

Os fagócitos ativados são os grandes produtores de radicais livres e de citocinas mediadoras de alterações metabólicas que podem favorecer a sua formação; quando aderidos à parede vascular, induzem a transformação da xantina desidrogenase em xantina oxidase nas células endoteliais aumentando, assim, a produção de radicais livres do oxigênio; o excesso de utilização de proteínas plasmáticas na sepse favoreceria a ocorrência dos metais de transição em estado redox disponíveis para geração de radicais hidroxil.

Observações em pacientes com SIRS têm mostrado haver redução dos níveis plasmáticos de vitaminas antioxidantes e beta-caroteno e aumento dos níveis de produtos reativos com o ácido barbitúrico, indicando grande produção de radicais livres, mas dados a respeito de um possível efeito benéfico da utilização de antioxidantes ainda são incipientes.

#### **IV. Radicais Livres e Envelhecimento 15.**

A idéia de que o envelhecimento seja conseqüência do acúmulo de efeitos lesivos aleatórios produzido nas células por radicais livres ganhou maior número de adeptos após a demonstração da produção contínua desses radicais nas células normais. Os defensores da teoria começaram a acumular dados que favorecem a relação entre estresse oxidativo e envelhecimento, entre eles:

(a) o acúmulo, com o avançar da idade, de produtos de peroxidação de lípidos e de proteínas alteradas por processos oxidativos, na forma de corpos residuais nas células perenes

(b) o envelhecimento acelerado após a irradiação total do corpo

(c) o aumento, com a idade, da excreção urinária de bases orgânicas modificadas por oxidação e

(d) a redução progressiva nos mecanismos antioxidantes nos tecidos. Também tem sido demonstrada uma relação direta entre capacidade antioxidante (SOD, ácido úrico e ceruloplasmina) e longevidade em diferentes espécies animais: as de maior longevidade teriam mecanismos antioxidantes mais eficientes. No entanto, essa observação não foi confirmada para alguns antioxidantes, como glutathiona-peroxidase e catalase, tendo sido observada, inclusive, relação inversa.

Embora haja evidências de que o processo de envelhecimento se associe com uma progressiva alteração no controle dos processos oxidativos das células, não há evidências concretas de que essa perda progressiva na homeostase do oxigênio seja a causa ou uma consequência do envelhecimento. É perfeitamente possível que as alterações moleculares decorrentes de outros mecanismos que disparam o envelhecimento sejam as responsáveis pela redução na capacidade antioxidante ou pelo descontrole dos processos oxidativos normais, levando à geração de maior quantidade de radicais livres.

Ainda que tenham havido tentativas, nenhum trabalho experimental chegou a demonstrar que a introdução de grande quantidade de antioxidantes na dieta tenha aumentado a duração da vida ou reduzido o processo de envelhecimento em qualquer espécie animal.

Por outro lado, doenças degenerativas crônicas que acompanham o envelhecimento (aterosclerose e câncer) parecem de fato relacionadas à produção de radicais livres, e o uso de antioxidantes para a sua prevenção será discutido ainda neste capítulo.

## **V. Radicais Livres, Antioxidantes e Aterosclerose 2,8,10,18,19.**

A suspeita de que radicais livres pudessem estar envolvidos na patogênese da aterosclerose foi decorrente da observação de que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) depositadas no ateroma são modificadas, especialmente por processos de oxidação, e que as LDL do plasma podem ser peroxidadas *in vitro* por ação de radicais derivados do oxigênio. Mostrou-se ainda que os macrófagos e as células musculares lisas da íntima das artérias têm receptores especiais para as LDL oxidadas, denominados receptores de remoção, os quais não são modulados pelos níveis de LDL endocitadas, como ocorre com os receptores para as LDL nativas, existentes nas diferentes células.

Em consequência da não-modulação dos receptores, os macrófagos e as células musculares lisas da íntima se abarrotam de LDL oxidada, iniciando a formação do depósito lipídico na íntima; por outro lado, as LDL oxidadas alteram a biologia do endotélio e das plaquetas, aumentando a facilidade de adesão dessas últimas na superfície endotelial, além de promoverem a migração e a paralisação de macrófagos na íntima.

Admite-se que os radicais livres, especialmente o radical hidroxil, peroxidem os lípidos insaturados da LDL, originando lipoperóxidos e produtos de sua decomposição, como o malondialdeído, os quais peroxidam e, portanto, modificam cadeias laterais de aminoácidos da apoproteína B, fazendo aparecer novos epítopos, agora reconhecidos pelos receptores de remoção de LDL dos macrófagos. Comprova essa hipótese a observação do aparecimento, no plasma de pacientes ateroscleróticos, de anticorpos antiapoproteína B modificada (anticorpos anti-HDL oxidada).

Vários estudos têm mostrado a presença de auto-anticorpos anti-LDL em pacientes ateroscleróticos, em fumantes inveterados e em diabéticos, geralmente em níveis mais elevados do que em pacientes de controle sem essas condições; uma relação entre títulos progressivos dos auto-anticorpos anti-HDL e agravamento da aterosclerose das carótidas foi observada em alguns pacientes.

Quantidades maiores de LDL oxidada e de produtos secundários de lipoperoxidação têm sido observadas no plasma de pacientes ateroscleróticos e em fumantes

inveterados.

Experimentos in vitro mostraram que os antioxidantes podem inibir a peroxidação das LDL: (a) O plasma humano, exposto à ação de substâncias que geram radicais livres a partir do oxigênio, mostra uma relação inversa entre o consumo dos antioxidantes naturais (vitaminas C e E, urato, carotenóides) e o aparecimento de produtos originados de peroxidação das LDL; (b) se as LDL plasmáticas forem isoladas do seu conteúdo em vitamina E (que normalmente é encontrada associada às LDL), elas são facilmente peroxidadas e a reposição de vitamina E e vitamina C induz grande proteção contra essa peroxidação.

Existem observações experimentais e epidemiológicas tentando esclarecer a ação dos antioxidantes sobre a ocorrência e a evolução da aterosclerose. Deficiência crônica das vitaminas C e E se relaciona com o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em roedores, porcos e primatas, e a suplementação com vitamina E reduz a aterosclerose induzida no coelho e em porcos através de dietas aterogênicas.

Os estudos epidemiológicos têm sido de comparação do risco para aterosclerose e suas conseqüências em populações com hábitos alimentares distintos (estudos de cruzamento de culturas), estudos caso-controle, estudos observacionais em coortes e estudos de intervenção. Como poderá ser visto, todos apresentam falhas e deixam dúvidas quanto a sua interpretação, apesar de alguns estudos em andamento prometerem resultados mais consistentes.

De modo geral, a maior ingestão de frutas e verduras se relaciona com menor risco para aterosclerose. Na Escócia, a ocorrência de doença cardíaca coronariana é significativamente maior do que na Inglaterra, havendo muito menor consumo de vegetais entre os escoceses do que entre os ingleses. Não se pode afirmar que esse menor risco esteja relacionado aos antioxidantes, mais abundantes nas dietas ricas em vegetais, já que outros fatores relacionados a essas dietas são também comprovadamente protetores, como as fibras, menor conteúdo em gorduras saturadas e maior conteúdo em ácido linoléico.

Estudos com a avaliação quantitativa dos antioxidantes no plasma permitem uma melhor correlação com o risco para a aterosclerose. Um estudo europeu multicêntrico, envolvendo 16 regiões diferentes, avaliou os níveis de vitaminas C e E e de beta-caroteno, em um mesmo laboratório, em amostra significativa das populações, apresentando resultados ainda não esclarecedores: na comparação dos níveis plasmáticos de antioxidantes com as taxas regionais de mortalidade, observou-se apenas uma correlação inversa entre os níveis de vitamina E e a mortalidade por doença coronariana, uma tendência para uma correlação semelhante para a vitamina C e ausência de correlação em relação ao beta-caroteno e o selênio, quando se avaliou a população de todas as regiões em conjunto.

A análise isolada na Finlândia, na Escócia e na Itália não mostrou correlação significativa entre os níveis de vitaminas E e C e a mortalidade por aterosclerose coronariana. Essas observações são questionáveis, pois os dados não foram ajustados para outros fatores de risco, como níveis de colesterol, hábitos de fumar etc.

Um estudo de caso-controle feito na Suécia mostrou relação inversa entre níveis plasmáticos de antioxidantes (vitaminas E e C, beta-caroteno) e doença coronariana (diagnosticada por um questionário para avaliar presença de angina). Após ajuste dos dados para idade, hábito de fumar, pressão arterial, peso corporal e lipemia, apenas os níveis de vitamina E permaneciam independentemente

associados a menor risco de angina.

Estudos de caso-controle feitos na Finlândia e na Holanda não mostraram correlação entre os níveis plasmáticos de antioxidantes (vitaminas C e E, beta-caroteno e selênio) e a mortalidade por doença coronariana. Nesses dois estudos há uma ressalva importante: a dosagem dos antioxidantes plasmáticos foi feita em soros armazenados por longo período, o que pode ter interferido nos resultados, e os casos incluídos no estudo tinham maior possibilidade de apresentar manifestações da doença coronariana e já poderiam ter modificado os hábitos alimentares antes de terem entrado no estudo.

Alguns estudos observacionais prospectivos (coortes) têm mostrado que a suplementação dietética com antioxidantes reduz o risco de doença coronariana. Em um desses estudos, foram observadas 87.245 enfermeiras americanas com idades entre 34 e 59 anos, que não apresentavam uma história básica sugestiva de doença coronariana, acidente vascular cerebral ou outra doença cardiovascular (Women's Health Study). A ingestão de antioxidantes na dieta foi obtida através de um questionário dirigido para avaliação semiquantitativa da qualidade alimentar, e a ingestão de antioxidantes como suplementação alimentar foi avaliada a cada dois anos.

Durante oito anos de observação, verificou-se menor risco para desenvolvimento de doença coronariana nas mulheres que utilizaram suplementação alimentar com vitamina E. O menor risco continuou existindo após o ajuste para idade, hábito de fumar, peso corporal, níveis de colesterol, menopausa, diabetes, uso de aspirina, de álcool e de compostos com múltiplas vitaminas ou vitamina C ou beta-caroteno, quando se comparou o grupo do mais baixo quintil com o do mais alto, em relação aos níveis ingeridos de vitamina E. O efeito de redução de risco só foi observado após o uso de vitamina E por, no mínimo, dois anos. Observou-se uma tendência de redução de risco para doença coronariana nas mulheres com dietas mais ricas ou com suplementação de beta-caroteno e vitamina C, mas sem diferenças estatisticamente significativas.

Estudo semelhante, feito em 39.910 homens, entre 40 e 75 anos de idade, sem história de doença cardiovascular (Physician's Health Study), mostrou que a ingestão de pelo menos 100 UI de vitamina E, por um período superior a dois anos, diminuiu o risco para doença coronariana, fato não observado em relação à vitamina C. A ingestão de maior quantidade de beta-caroteno diminuiu o risco para doença coronariana entre os que fumavam ou que já foram fumantes.

Esses resultados, mostrando efeito protetor da vitamina E sobre a doença coronariana, apresentam algumas limitações. As pessoas que usam suplementação vitamínica regular geralmente apresentam hábitos diferentes daquelas que não usam, especialmente em relação ao fumo, exercício físico e uso de aspirina. Há demonstrações de que o exercício físico melhora as condições antioxidantes do organismo.<sup>1</sup> É possível, portanto, que o uso das vitaminas antioxidantes esteja associado a outros comportamentos que diminuem o risco para aterosclerose coronariana, confundindo os resultados.

O efeito protetor do beta-caroteno sobre a ocorrência de doença coronariana foi feito em 1.299 idosos, observados durante 4,5 anos em relação à ingestão daquele antioxidante: o risco de morte por problema cardiovascular foi de 0,54 naqueles que estavam no mais alto quartil dos escores de ingestão de beta-caroteno. Outro estudo prospectivo foi feito com 333 homens com história de angina e/ou com revascularização do miocárdio, antes da distribuição aleatória: os que receberam

50 mg de beta-caroteno em dias alternados apresentaram 44% de redução nas principais complicações da doença coronariana, depois do ajuste em relação à idade e ao uso de aspirina.

Esse efeito só foi observado após dois anos de seguimento, o que confirma a hipótese de que os antioxidantes podem prevenir a progressão da aterosclerose. Um grande estudo observacional prospectivo, feito em Basel, envolveu 2.975 homens saudáveis, cujos níveis basais das vitaminas C, E e A e de beta-caroteno foram avaliados previamente. Após sete anos de seguimento, verificou-se não haver qualquer correlação entre os níveis basais de vitaminas beta-caroteno e a mortalidade por doença coronariana.

No entanto, observações feitas após 12 anos mostraram que o risco para doença isquêmica do coração e do sistema nervoso aumentou nos pacientes com níveis muito baixos de vitamina C (< 22,7 mmol/l) e de beta-caroteno (< 0,23 mmol/l). A avaliação do risco em relação aos baixos níveis plasmáticos de vitamina E ficou prejudicada porque os menores níveis observados estiveram em torno de valores considerados como limite mínimo (27,5-30 mmol/l).

Testes aleatórios (ou randomizados), bem controlados, têm mostrado resultados conflitantes em relação ao benefício do uso de antioxidantes na progressão da doença coronariana. Testes aleatórios utilizando a vitamina E em pacientes com angina não têm mostrado efeito significativo da intervenção na melhora da sintomatologia, em relação ao placebo. Esses testes, no entanto, foram feitos com pequeno número de pacientes, e a observação não durou mais de seis meses. Em um estudo aleatório, em andamento em Atlanta, com 115 pacientes submetidos à angioplastia, verificou-se, após quatro meses, que o grupo tratado com vitamina E teve 36% de reestenose, comparado com 50% no grupo que recebeu o placebo, não sendo a diferença estatisticamente significativa. Aqui, embora o número de pacientes seja adequado, o tempo de observação é ainda muito pequeno.

Publicação recente de um estudo feito na Finlândia com a suplementação dietética com beta-caroteno e alfa-tocoferol, isolados ou em associação, mostrou que, em relação ao alfa-tocoferol, houve tendência à redução do risco para mortalidade por doença coronariana ou acidente vascular cerebral e, para o beta-caroteno, houve tendência para aumento do risco, resultados sem significância estatística para as duas substâncias. No entanto, há críticas a esse trabalho: o alfa-tocoferol utilizado tinha pouca bioatividade, e a dose utilizada foi de 50 mg, o que não elevou os níveis plasmáticos da vitamina acima de 50% do normal. Alguns admitem a necessidade de, no mínimo, 100 mg de alfa-tocoferol, tomados diariamente, para reduzir o risco de doença coronariana.

Estudos aleatórios em andamento, para avaliar o efeito da suplementação da dieta com antioxidantes sobre o risco de desenvolvimento de doença coronariana em homens (Physician's Health Study) e mulheres (Women's Health Study) sem história de doença cardiovascular, quando terminados, certamente trarão maiores esclarecimentos sobre a utilização dessa suplementação dietética como método de prevenção para a aterosclerose. Um estudo paralelo ao Women's Health Study, o Women's Antioxidant Cardiovascular Disease Study, está avaliando a utilização de vitamina E (400 mg), vitamina C (1 g) e beta-caroteno (20 mg) para prevenção da progressão da aterosclerose já estabelecida.

Os resultados dos diferentes estudos quanto ao possível papel protetor dos antioxidantes (da dieta ou utilizados como suplemento alimentar) sobre o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose levam a algumas reflexões:

(a) são resultados animadores, embora ainda não absolutamente confirmados, e todos eles passíveis de crítica, tendo em vista que vícios podem ter ocorrido na amostragem, no acompanhamento e na avaliação dos resultados, pois as pessoas que tomam vitaminas mostram hábitos geralmente diferentes daquelas que não tomam, em relação a fatores de risco para doença coronariana

(b) resultados significativos têm sido observados quando a comparação é feita entre os quintis ou quartis extremos dos níveis dos antioxidantes

(c) em todos os estudos observacionais prospectivos, pouco se relata sobre efeitos colaterais indesejáveis devido ao uso prolongado de antioxidantes, tudo indicando que eles não ocorreram nos períodos de observação feitos até agora

(d) poucas discussões têm sido feitas a respeito das doses que podem ser eficazes e seguras, necessitando maiores investigações sobre as quantidades que permitem uma elevação da concentração sérica e tecidual do antioxidante realmente capaz de reduzir o risco da doença

(e) alguns autores comentam que a grande propaganda sobre os efeitos benéficos dessa quimioprevenção possa desencorajar as pessoas a tomarem outros hábitos sabidamente importantes na prevenção da aterosclerose, como dieta adequada e exercício físico. Em face dessas considerações, o médico deve mostrar, ao paciente que deseja tomar os antioxidantes, que os dados existentes ainda requerem confirmação e que existem modificações nos hábitos de vida que são extremamente importantes na prevenção e na progressão da doença coronariana, independentemente da suplementação dietética com antioxidantes.

## **VI. Radicais Livres, Antioxidantes e Neoplasias 4,9,12,14,19,20.**

A participação de radicais livres na patogênese das neoplasias é reforçada por diversos trabalhos experimentais mostrando que, genericamente, o tratamento com antioxidantes exerce efeito anticarcinogênico e que o aumento do estresse oxidativo aumenta a carcinogenicidade, induzida por diferentes agentes. Como os radicais livres podem alterar o metabolismo dos carcinogênicos químicos, a estrutura do DNA, influenciar nos mecanismos de controle da expressão gênica e nos mecanismos de recepção, transdução e transmissão de estímulos que chegam às células, é fácil concluir que eles devem exercer um efeito pleiotrópico na carcinogênese, podendo participar nas diferentes fases da indução, da promoção e da progressão dos cânceres.

No entanto, o efeito protetor dos antioxidantes (e o facilitador dos pró-oxidantes) varia nos diferentes tipos de modelos utilizados, sendo mais eficaz na proteção de alguns e ineficaz na proteção de outros tumores. Há raros relatos de experimentos nos quais o uso de antioxidantes favoreceu, em vez de impedir, o aparecimento do tumor.

Nos cânceres humanos, há observações epidemiológicas que apontam para um efeito protetor dos antioxidantes. Os primeiros estudos de caso-controle mostraram que a concentração sérica de antioxidantes foi significativamente mais baixa nos portadores de neoplasia do que nos controles, o que não demonstra se a redução no status antioxidante é causa ou conseqüência da doença. Alguns estudos de cruzamento cultural têm mostrado que a incidência de determinados cânceres, especialmente do pulmão, do esôfago e do estômago, está relacionada à baixa ingestão de vitaminas antioxidantes e caroteno na dieta.

Em uma região rural da China (Linxian), há uma baixa ingestão de micronutrientes na dieta, e a população tem uma alta incidência de câncer do estômago e do esôfago. A suplementação da dieta dessa população (29.000 adultos) durante um período de cinco anos, com vitaminas E, beta-caroteno e selênio, reduziu a mortalidade geral e por câncer gástrico no período, mas não influenciou na mortalidade por câncer de esôfago. Nos pacientes com lesões displásicas do esôfago, não se verificou alteração na evolução após uso prolongado de suplementação multivitamínica.

Estudos prospectivos de longa duração, feitos em diferentes regiões, também têm mostrado, de modo geral, que baixos níveis de antioxidantes estão relacionados com maior risco de desenvolvimento de neoplasias. Dos micronutrientes antioxidantes avaliados, o beta-caroteno é o que mais se relaciona com risco de desenvolvimento de câncer: baixos níveis na dieta ou no plasma são correlacionados com maior incidência de quase todos os tipos de neoplasias, especialmente em homens, havendo, no entanto, variações. Níveis baixos de vitamina E ou C também têm sido correlacionados à maior incidência de alguns cânceres (especialmente do tubo digestivo), mas de modo menos consistente.

Alguns estudos longitudinais não mostraram correlação entre níveis plasmáticos de beta-caroteno e câncer, tendo alguns demonstrado resultados inversos: altos índices de ingestão de caroteno associou-se à maior incidência de câncer do pulmão, segundo um estudo feito na Finlândia. Dados parciais sobre estudos de intervenção com o uso de beta-caroteno têm confirmado uma tendência para aumento de risco de câncer, especialmente do pulmão, no grupo de fumantes.

A observação de correlação inversa entre níveis de antioxidantes baixos no plasma e risco para câncer deve receber a mesma ressalva feita para a relação entre níveis elevados de antioxidantes na dieta e baixo risco para aterosclerose: os indivíduos com baixos níveis de antioxidantes no plasma podem ter associados – por hábitos ou por condições genéticas – outros fatores de risco para a ocorrência da neoplasia, responsáveis pela diferença apresentada. Por outro lado, mesmo que baixos níveis plasmáticos de antioxidantes se relacionem com aumento de risco para alguns cânceres, isto não significa que o aumento da ingestão em pessoas normais reduza esse risco.

Os estudos prospectivos e de intervenção em andamento, citados no item sobre aterosclerose, irão também contribuir para esclarecer melhor o real papel dos antioxidantes na prevenção das neoplasias humanas. Até o momento, os resultados desses estudos são inconsistentes, o que não autoriza ainda o uso indiscriminado dos antioxidantes como preventivos para neoplasias, especialmente em relação à vitamina A e ao beta-caroteno, cujos efeitos indesejáveis podem aparecer em doses pouco acima das consideradas suficientes para o organismo. O beta-caroteno é precursor da vitamina A, que é importante fator regulador da expressão gênica, daí o risco das doses excessivas.

Mais recomendável seria aumentar o consumo de vegetais, especialmente os mais ricos em antioxidantes, já que esse hábito certamente está ligado a menor risco para muitos cânceres, provavelmente porque fornecem não só antioxidantes em qualidade e quantidades adequadas, como também outros fatores importantes na anticarcinogênese.

## **VII. Os Radicais Livres e os Antioxidantes são um Mito ou uma Realidade?**

Os dados disponíveis até o momento, resultantes principalmente de trabalhos

experimentais, mostram inquestionavelmente que os radicais livres existem, são gerados nos processos metabólicos normais e que podem produzir lesões celulares e do interstício. Também os mecanismos antioxidantes estão presentes naturalmente nas células e representam a adaptação do tecido à presença dos radicais livres gerados no metabolismo.

Portanto, existe a possibilidade de que um desequilíbrio no sistema antioxidante possa participar na patogênese de algumas doenças. No entanto, ainda está por ser demonstrado se a ingestão de antioxidantes suplementares na dieta, por pessoas normais, pode melhorar as condições antioxidantes dos tecidos. O mito é criado em torno do assunto por quem utiliza fatos ou realidades científicas, sem competência para avaliá-los, e para propor intervenções com métodos ou produtos, cujos efeitos ainda não são adequadamente conhecidos.

### **Referências Bibliográficas**

1. Aruoma OI. Free radicals and antioxidant strategies in sports. *J Nutr Biochem* 1994; 5:370-81.
2. 2. Burton GW. Vitamin E: molecular and biological function. *Proc Nutr Soc* 1994; 53:251-62.
3. 3. Cheesman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bul* 1993; 49:481-93.
4. 4. Collins A, Duthie S, Ross M. Micronutrients and oxidative stress in the aetiology of cancer. *Proc Nutr Soc* 1994; 53:67-75.
5. 5. Fliter WD. Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Brit Med Bul* 1993; 49:545-55.
6. 6. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Brit Med Bul* 1993; 49:566-76.
7. 7. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 1994; 97(suppl 3A):5-13.
8. 8. Gey KF. Prospects for prevention of free radical disease, regarding cancer and cardiovascular disease. *Brit Med Bul* 1993; 49:679-99.
9. 9. Hennekens CH. Antioxidants vitamins and cancer. *Am J Med* 1994; 97(suppl 3A):2-4.
10. 10. Hoffman RM, Garewal HS. Antioxidants and the prevention of coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1995; 241-46.
11. 11. Holley AE, Cheesman KH. Measuring free radical reactions in vivo. *Brit Med Bul* 1993; 49:494-505.
12. 12. Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Brit Med Bul* 1993; 49:523-44.
13. 13. Jackson MJ. Can dietary micronutrients influence tissue antioxidant capacity? *Proc Nutr Soc* 1994; 53:53-7.

14. 14. Lupulescu A. The role of vitamins A, b-carotene, E and C in cancer cell biology: a review. *Int J Vit Nutr Res* 1994; 64:3-14.
15. 15. Nohl H Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *Brit Med Bul* 1993; 49:653-67.
16. 16. Rangan U Bulkley GB. Prospects for treatment of free radicalmediated tissue injury. *Brit Med Bul* 1993; 49:700-18.
17. 17. Rel H Gasse Schlag G Marzi I. Involvement of oxygen radicals in schock related cell injury. *Brit Med Bul* 1993; 49:556-65.
18. 18. Riemersma RA. Epidemiology and the role of antioxidants in preventing coronary heart disease: a brief overview. *Proc Nutr Soc* 1994; 53:59-65.
19. 19. Stavric B. Role of chemopreventers in human diet. *Clin Biochem* 1994; 27:319-32.
20. 20. Uddin S, Ahmad S. Antioxidants protection against cancer and other human diseases. *Comprehensive Therapy* 1995; 21:41-5.
21. Copyright © 2000 eHealth Latin America