



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX PLASMÁTICO EM PACIENTES COM
CÂNCER ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE OXIDANTE E
ANTIOXIDANTE TOTAL**

Aluna: Clarissa Aires de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

**UBERLÂNDIA - MG
2022**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX PLASMÁTICO EM PACIENTES COM
CÂNCER ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE OXIDANTE E
ANTIOXIDANTE TOTAL**

Aluna: Clarissa Aires de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA - MG
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48a
2022 Oliveira, Clarissa Aires de, 1972-
Avaliação do estado redox plasmático em pacientes com câncer através da determinação da capacidade oxidante e antioxidante total [recurso eletrônico] / Clarissa Aires de Oliveira. - 2022.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.7009>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. I. Espíndola, Foued Salmen, 1957-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Dezenove dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	15:30h	Hora de encerramento:	16:00h
Matrícula do Discente:	12022GBI004				
Nome do Discente:	Clarissa Aires de Oliveira				
Título do Trabalho:	Avaliação do estado redox plasmático em pacientes com câncer através da determinação da capacidade oxidante e antioxidante total.				
Área de concentração:	Bioquímica.				
Linha de pesquisa:	Bioquímica redox e estresse oxidativo, enzimologia e marcadores bioquímicos.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Diagnóstico pela saliva: descoberta e inovação em biomarcadores para o exercício físico, estresse e saúde bucal.				

Aos dezenove dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e dois, às 15:30 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Cisco Webex, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Foued Salmen Espindola (Orientador), Dr. Morun Bernardino Neto e Dr^a. Renata Roland Teixeira. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Foued Salmen Espindola apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a

tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/12/2022, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Morun Bernardino Neto, Usuário Externo**, em 19/12/2022, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Roland Teixeira, Técnico(a) de Laboratório**, em 21/12/2022, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4088061** e o código CRC **88DC9EF9**.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX PLASMÁTICO EM PACIENTES COM
CÂNCER ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE OXIDANTE E
ANTIOXIDANTE TOTAL**

ALUNO: Clarissa Aires de Oliveira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Examinadores:

Prof. Dr. Morun Bernardino Neto – USP-Lorena -SP

Profa. Dra. Renata Roland Teixeira – IBTECUFU-Uberlândia-MG

Prof. Dr. Miguel Junior Sordi Bortolini – Universidade Federal do Acre

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – IBTECUFU-Patos de Minas-MG

Data da Defesa: 19/12/2022

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho Àquele que, em todos os momentos, foi minha base, me presenteou com a renovação diária, energia da vida, cuidando de todos os mínimos detalhes: Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha base familiar e em especial o meu esposo Dr Eugenio Luigi Iorio que me inspira seguir o caminho da ciência.

Agradeço também ao meu bisavô Coquelim Leal Costa, à Universidade Federal de Uberlândia e aos seus docentes que me incentivaram a percorrer o caminho da pesquisa científica, em especial meu orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola.

SUMÁRIO

	Pág.
Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Apresentação	01
Capítulo 1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	04
1. Câncer	04
2. Sistema redox e estresse oxidativo	06
2.1 Visão geral	06
2.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies não radicais	09
2.3 Antioxidantes	12
2.4 Di-estresse oxidativo e doenças degenerativas	16
3. Avaliação do estado redox	20
3.1 Considerações gerais	20
3.2 Avaliação da capacidade oxidante total do plasma (d-ROMs test)	24
3.3 Avaliação da Capacidade antioxidante total (BAP test)	25
4. Considerações finais	27
5. Referências	46
Capítulo 2 - Characterization of the redox status of cancer patients through the d-ROMs and BAP test and correlation of these parameters with blood variables	53

Resumo	55
Abstract	56
Introduction	57
Materials and methods	58
Population	58
Blood collections and determination of hematological and biochemical variables	59
Measurements of d-ROMs and BAP test	60
Calculation of the Oxidative stress index (OSI) and BAP/dROMs	61
Statistical analysis	61
Results	61
Discussion	62
References	66

ABREVIATURAS

BAP	Capacidade antioxidante total (total antioxidant capacity)
BAP/dROMs index	Índice BAP/dROMs
CAT	Catalase
CSC	Conceito Saúde Clinic (clínica conceito saúde)
CRP	C-reactive protein (proteína C reativa)
Cu-SOD	Cobre SOD
Cu-Zn-SOD	Cobre-zinco-SOD
DAAO	Diamino oxidase
DB	Direct bilirubin (bilirrubina direta)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPD	N,N-dietilparafenilendiamina (N, N-diethylparaphenylenediamine)
d-ROMs	Metabólitos reativos do oxigênio (reactive oxygen metabolites)
E-Q'	Tocoferol
ESR	Erythrocyte sedimentation rate (taxa de sedimentação de eritrócitos)
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
Fe 2⁺	Ferro no estado ferroso (iron in the ferrous state)
Fe3⁺	Ferro no estado férrico (iron in the ferric state)
FeCl³	Cloreto férrico
Fe-SOD	Ferro-SOD
FRAP	Capacidade de redução férrica do plasma
GPx	Glutathiona peroxidase

GSH	Glutathiona reduzida
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobin (hemoglobina)
HNO₂	Ácido nitroso
HO·	Radical hidroxila
HOCl	Ácido hipocloroso
HAS	Serum albumin (albumina sérica)
Ht	Hematocrit (hematócrito)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Leu	Total leukocytes (leucócitos totais)
LPO	Peroxidação lipídica
µL	Microlitros
µmol/L	Micromol por litro
MAO	Monoamina oxidase
MCH	Mean corpuscular volume (hemoglobina corpuscular média)
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration (concentração de hemoglobina corpuscular média)
MCV	Mean corpuscular volume (volume corpuscular médio)
Mn-SOD	Manganês-SOD
MPx	Mieloperoxidase
NDPr	Nucleotídeo difosfato redutase
N₂O₄	Tetróxido nítrico
N₂O₃	Trióxido nítrico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	Nanômetros

NO•	Óxido nítrico
NO₂⁺	Cátion nitrônio
NOS	Óxido nítrico sintase
¹O₂	Oxigênio singlete
O₂	Dióxido de oxigênio
O₂⁻	Ânion superóxido
O₃	Ozônio
ONOO⁻	Peroxido nitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
OSI	Oxidative stress index
Plt	Platelets (plaquetas)
Q•	Semiquinona
R•	Radical alquil
RBC	Erythrocytes (eritrócitos)
RDW	Red cell distribution width (variação de tamanho dos eritrócitos)
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas do oxigênio
ROO•	Radical (alquil) peroxil
ROOH	(Alquil) hidroperóxido
ROONO⁻	(Alquil) peroxinitrito
RS•	Radical tiil
RSS	Espécies reativas do enxofre
SOD	Superóxido desmutase
U CARR	Unidade Carratelli

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo 1	
Figura 1	A visão do câncer na Medicina Integrativa. 28
Figura 2	Hallmarks do câncer. 29
Figura 3	Mecanismo elementar de funcionamento do sistema redox. 30
Figura 4	Mecanismo fisiológico de formação de espécies reativas oxidantes. 31
Figura 5	Representação esquemática do sistema redox (TAO REDOX). 32
Figura 6	Sistema redox e estresse oxidativo. 33
Figura 7	Representação esquemática das patologias associadas ao di-estresse oxidativo. 34
Figura 8	Espécies reativas oxidantes de maior interesse biológico. 35
Figura 9	Espécies reativas centradas em oxigênio. 36
Figura 10	Meios de redução do oxigênio molecular ao nível da cadeia respiratória mitocondrial em condições fisiológicas. 37
Figura 11	A reação de Fenton sobre o peróxido de hidrogênio. 38
Figura 12	Classificação das espécies químicas redutoras/antioxidantes com base no critério da fonte de produção. 39
Figura 13	Representação esquemática da classificação das espécies redutoras/antioxidantes com base na sua distribuição no organismo humano. 40
Figura 14	Heterogeneidade química das espécies químicas redutoras/antioxidantes. 41
Figura 15	Características gerais da enzima superóxido dismutase. 42
Figura 16	Relações entre estresse oxidativo e inflamação. 43
Figura 17	Representação esquemática dos testes mais comuns utilizados na prática clínica para medir o estresse 44

	oxidativo.	
Figura 18	Avaliação global do estresse oxidativo.	45
		Pág.
	Capítulo 2	
Figure 1	Study sample selection criteria	78
Figure 2	Characterization of the subjects' redox balance using the d-ROMs and BAP test.	79

LISTA DE TABELAS

		Pág.
	Capítulo 2	
Table 1	Baseline characteristics of the study population	75
Table 2	Characterization of the hematological and biochemical profile of study subjects (N=57).	76
Table 3	Spearman Correlation between pairs of all subjects' variables (N=57).	77

APRESENTAÇÃO

A Biologia ensina que todas as funções vitais são o efeito final de uma corrente elétrica gerada pelo sol, induzida pela estimulação de fotossensores específicos (por exemplo, clorofila) por radiação visível e ultravioleta. Essa evidência finalmente dá forma e substância ao que filósofos e cientistas, ao longo dos séculos, entenderam ou conceituaram como "fluxo vital". Considerando que uma corrente elétrica é uma passagem de elétrons e que a transferência de elétrons de uma espécie redutora para um oxidante define uma reação de oxidação-redução, podemos dizer que são os processos redox que, bem controlados, sustentam a vida, em todas as suas manifestações, ou torná-la mais difícil, por doença, quando fora de controle.

De fato, processos redox, baseados na transferência de equivalentes redutores (elétrons isolados ou ligados a prótons, na forma de átomos de hidrogênio) entre determinadas espécies químicas, estruturalmente predispostas a isso, estão envolvidos em todos os fenômenos vitais, desde o controle de metabolismo à modulação do fluxo de informação. Portanto, os processos redox são os principais anéis bioquímicos de conjunção entre todos os organismos vivos, de procariontes a eucariotos, de plantas a animais, apesar das profundas diferenças estruturais e evolutivas.

O desenvolvimento de técnicas cada vez mais sofisticadas, algumas das quais hoje nos permitem ver o desenvolvimento de algumas reações redox "in vivo", levou nos últimos anos à definição do conceito de sistema redox e, portanto, ao desenvolvimento da redoxômica moderna.

O sistema redox é um sistema bioquímico onipresente com propósitos adaptativos que, em resposta a uma ampla gama de estímulos físicos, químicos ou biológicos, explora a troca de equivalentes redutores isolados entre espécies químicas oxidantes, alvos biológicos e espécies químicas redutoras para gerenciar via de sinalização ou de defesa essenciais para a sobrevivência. Em outras palavras, o sistema redox é o sistema bioquímico especializado no controle do estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é uma "declinação bioquímica" do fenômeno biológico mais geral do estresse, entendido como uma reação imediata a um evento ameaçador e potencialmente letal que, no caso específico do estresse emocional, visa predispor o sujeito à luta ou fuga. Se a resposta do sistema redox (por exemplo, aquela associada à membrana celular de granulócitos neutrófilos) for eficiente, a ameaça (por exemplo, uma infecção bacteriana) é prontamente neutralizada e o organismo sobrevive: eu-estresse oxidativo. Se, por outro lado, o sistema redox for incapaz de gerenciar a resposta (por exemplo, devido a deficiências genéticas, como observado na granulomatose crônica), o organismo pode adoecer ou até sucumbir (por exemplo, devido à sepse): di-estresse oxidativo.

Assim como a manutenção de uma condição de eu-estresse oxidativo é desejável para promover ou recuperar um ótimo estado de bem-estar e, por conseguinte, alcançar um envelhecimento bem sucedido, também um di-estresse oxidativo pode favorecer o envelhecimento prematuro e/ou patológico, facilitando também o aparecimento ou agravamento de doenças metabólicas, inflamatórias e degenerativas, incluindo câncer. Portanto, enquanto o eu-estresse oxidativo deve ser favorecido ou, pelo menos, não combatido, o di-estresse oxidativo deve ser prevenido ou erradicado se já estiver em andamento.

Infelizmente, o di-estresse oxidativo não é uma patologia no sentido convencional do termo, mas um fator de risco capaz de ameaçar o bem-estar de qualquer organismo vivo. Como tal, ao contrário de uma doença clássica, não origina nenhum quadro clínico específico, mas esconde-se por detrás do envelhecimento não fisiológico ou das patologias a que está associado, estimadas em pelo menos uma centena, das quais pode ser a causa ou a consequência.

Portanto, uma condição de di-estresse oxidativo só pode ser evidenciada por meio de exames laboratoriais específicos, prerrogativa da redoxômica moderna. Alguns destes testes, como o teste de metabólitos reativos do oxigênio (d-ROMs) e o teste da capacidade antioxidante total (BAP), têm-se afirmado ao longo dos últimos 20 anos em vários países do mundo pela sua relação custo/benefício favorável, em termos de simplicidade de execução, desempenho analítico e, sobretudo, pela capacidade de evidenciar alterações *ex vivo* no funcionamento do sistema redox em condições clínicas específicas, que a

literatura científica refere estar associada ao stress oxidativo. Falamos, em particular, do câncer.

Neste contexto, o objetivo desta dissertação é apresentar uma visão original e atualizada do estresse oxidativo, não convencional, antinômica, entre radicais livres e antioxidantes, como parte de um trabalho de pesquisa igualmente original durante o qual, pela primeira vez, uma população de pacientes brasileiros, em sua situação clínica específica, foram submetidos à avaliação do balanço oxidativo plasmático por meio da determinação da capacidade oxidante total (teste d-ROMs) e do potencial antioxidante biológico (teste BAP). Para fins didáticos, este trabalho foi dividido em dois capítulos. O Capítulo 1 fornece uma visão geral da etiopatogenia do câncer à luz dos processos redox, em termos de mudanças no sistema redox e estresse oxidativo. Já o Capítulo 2 refere-se ao próprio estudo experimental que objetivou avaliar o status redox em um grupo de pacientes com câncer residentes no Brasil.

Capítulo 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Câncer

O câncer é uma doença multifatorial de múltiplos estágios cuja impressão digital celular é a perda de algumas características genotípicas/fenotípicas e a aquisição de novas. No passado, para resumir tais alterações por um mero ponto de vista citológico, foi cunhado o termo “anaplasia”. De qualquer forma, devido ao processo carcinogênico, as células cancerígenas, oriundas de um tecido inicialmente “normal”, sofrem uma proliferação descontrolada e posterior colonização em órgãos distantes (metástase) (HANAHAN; WEINBERG, 2017). Um câncer primário pode “materializar-se” como uma massa sólida e infiltrante (neoplasia ou tumor, como adenocarcinoma) ou pode manter a característica de células circulantes livres separadas (neoplasias líquidas, como leucemia), ainda capazes de “colonizar” órgãos distantes (FIASCHI; CHIARUGI, 2012; HANAHAN, 2022).

A etiopatogenia do câncer é incrivelmente complexa, mas sabe-se que esta doença surge e se desenvolve como resultado de interações biológicas perturbadas entre células geneticamente/metabolicamente modificadas (“células anaplásicas”) e seus tecidos circundantes (microambiente tumoral), em um quadro geral (“terreno biológico”) de fatores epigenéticos/ambientais perturbados capazes de favorecer condições de doença (principalmente poluição, estilo de vida impróprio, estresse, disbiose intestinal, doenças predisponentes) (**Figura 1**) (HANAHAN, 2022; HANAHAN D., 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011, 2017).

Apesar de tais aquisições baseadas em evidências, por muitos anos não havia uma definição universalmente compartilhada de câncer e os mecanismos associados com o seu desenvolvimento e progressão, pelo menos até que a pesquisa fundamental de Hanahan & Weinberg fosse publicada pela primeira vez em 2000 no artigo altamente citado "*The hallmarks of cancer*" (HANAHAN D., 2000). Essa abordagem didática abriu a janela para a possibilidade de identificar e, portanto, estudar o câncer com base em seus principais aspectos, ou seja, as características do câncer.

A publicação de Hanahan & Weinberg em 2000, apresentou uma nova visão do comportamento tumoral, contrapondo uma visão reducionista de tecido tumoral inerte geneticamente modificado, passando a considerar que as células tumorais atuam de maneira a recrutar células normais de tecidos subjacentes a elas, para atuar como colaboradores ativos de sua ação neoplásica. A partir dessas interações celulares e alterações na fisiologia das células tumorais, foram inicialmente identificadas seis capacidades funcionais adquiridas pelas células humanas à medida que sofrem um processo de transformação neoplásica. Mais especificamente, são habilidades fundamentais para o desenvolvimento de tumores malignos. Esta categoria inclui: autossuficiência em sinais estimuladores de crescimento; insensibilidade para fatores que inibem o crescimento; invasão de outros tecidos e capacidade de fazer metástases; potencial ilimitado de multiplicação; angiogênese induzida e bloqueio dos mecanismos naturais de morte celular (HANAHAN D., 2000).

Em 2011, outras quatro características foram adicionadas aos *hallmarks*, sendo duas delas consideradas características emergentes, a reprogramação do metabolismo celular e a evasão do sistema imune (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Com os avanços no descobrimento dos fatores associados ao desenvolvimento do câncer os estudos associando os hallmarks com o estresse oxidativo, começaram a ser desenvolvidos, investigando a estreita relação entre estresse oxidativo e a carcinogênese (**Figura 2**) (FIASCHI; CHIARUGI, 2012; KUMARI et al., 2018; PERILLO et al., 2020).

O di-estresse oxidativo (mais tarde definido como uma resposta alterada do sistema redox a estímulos ou perturbações) é capaz de afetar e influenciar os mecanismos tumorais de proliferação e crescimento celular independente, causando insensibilidade a apoptose, sustentar a angiogênese e alterar o programa de migração/invasão através de mecanismos metabólicos e epigenéticos (FIASCHI; CHIARUGI, 2012; PERILLO et al., 2020).

Estudos prévios envolvendo di-estresse oxidativo e câncer demonstraram que alterações metabólicas e a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), estão interligadas nas células cancerosas (FIASCHI; CHIARUGI, 2012; GENCER et al., 2006; KIM; KIM; BAE, 2016; KUMARI et al., 2018; NISHIKAWA, 2008; PERILLO et al., 2020). O di-estresse oxidativo e a hipóxia são capazes de exercer

efeitos na reprogramação metabólica do microambiente tumoral, o que perturba as vias metabólicas, como também pode alterar o equilíbrio redox. Além disso, as células cancerosas podem desenvolver sistemas antioxidantes aumentados para sobreviver em ambientes de alto nível de di-estresse oxidativo (FIASCHI; CHIARUGI, 2012; PERILLO et al., 2020). Essas adaptações que as células tumorais desenvolvem, trazem impacto direto no tratamento do tumor. Por exemplo, as decisões de usar medicamentos, como quimioterápicos para aumentar a produção de ROS para atingir um nível tóxico ou antioxidantes para perturbar o estado redox, pode depender do tipo e estágio do câncer, dos níveis endógenos de ROS, da ativação de vias de sobrevivência induzidas por ROS e das perturbações metabólicas no câncer (KIM; KIM; BAE, 2016).

Neste cenário, fica evidente que o di-estresse oxidativo exerce um papel chave nos mecanismos de desenvolvimento e tratamento tumoral, sendo que o diagnóstico desse processo é algo relevante e promissor para o manejo terapêutico da doença.

2. Sistema redox e estresse oxidativo

2.1. Visão geral

O estresse oxidativo, como variante do fenômeno biológico denominado “estresse”, é a resposta adaptativa possibilitada por qualquer organismo vivo para enfrentar uma série de desafios físicos, químicos e biológicos (estressores) e, portanto, sobreviver (SIES, 2015). Comparado ao estresse comum, o estresse oxidativo não é gerenciado pelo sistema neuroendócrino-imunológico, mas sim pelo sistema redox (FORMAN; URSINI; MAIORINO, 2014).

Processos redox permeiam praticamente todos os processos fundamentais do organismo, desde o metabolismo à funções vitais (SIES, 2015). Nos seres humanos o sistema redox é constituído por 3 componentes básicos, as espécies reativas oxidantes (centradas no oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre, cloro), as espécies redutoras (basicamente, os chamados antioxidantes) e os alvos biológicos (por exemplo, proteínas, toxinas bacterianas) (**Figura 3**).

A função do sistema redox é modular funções biológicas relevantes (por exemplo, sinalização, defesa) através de reações de oxidação e redução, a fim de

construir respostas adaptativas essenciais para homeostasia e sobrevivência (FORMAN; URSINI; MAIORINO, 2014; SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Este sistema está presente em várias partes do corpo apresentando pequenas peculiaridades, na sua composição e funcionamento de acordo o microambiente de cada órgão.

Durante as reações redox ocorre a produção de ROS e outras substâncias oxidantes, que podem possuir elétrons não pareados (radicais livres) ou não (como peróxido de hidrogênio) em um dos orbitais mais externos. A configuração dessas espécies faz com elas sejam moléculas altamente instáveis, ávidas por elétrons, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas, podendo levar à oxidação de outras moléculas (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008). As ROS são formadas continuamente em organismos vivos através de mecanismos completamente fisiológicos (**Figura 4**) e em concentrações adequadas atuam em processos importantes, tais como, maturação de estruturas celulares, regulação, sinalização e defesa (NIKI, 2016).

Com o intuito de dar um suporte funcional, para que as moléculas oxidantes consigam desempenhar suas ações de forma efetiva e segura, ou seja, prevenindo seus efeitos indesejados, o organismo possui uma série de moléculas denominadas antioxidantes (ALI et al., 2020; TAFURI et al., 2016). A atuação de forma harmônica das substâncias oxidantes, com seus alvos biológicos e os antioxidantes promove a homeostasia no sistema redox, que se por algum motivo é desregulado, a condição denominada di-estresse oxidativo é instaurada no organismo.

Na verdade, o termo estresse oxidativo nos últimos anos está sofrendo modificações conceituais (SIES, 2020). O surgimento deste termo e sua definição, ocorreram em 1985 por Helmut Sies em seu livro *Oxidative Stress* no qual no capítulo introdutório definiu estresse oxidativo como sendo “um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante em favor do primeiro”. Isto ocorreu em uma época em que os ROS atraíram muita atenção por cientistas no campo da biologia, medicina, química, bioquímica, farmacologia e nutrição. Contudo, ao longo dos anos, o conceito de estresse oxidativo foi atualizado não sendo atribuído simplesmente ao desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, mas sim, como variante do fenômeno biológico denominado “estresse” (NIKI,

2016). Trata-se da resposta adaptativa possibilitada por qualquer organismo vivo para enfrentar uma série de desafios físicos, químicos e biológicos (estressores) e, portanto, sobreviver (SIES, 2015, 2019, 2020; TAFURI et al., 2016).

Conforme mostrado na **figura 5**, o mecanismo fisiológico do estresse oxidativo não representa apenas um desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, mas seu funcionamento se comporta como um “TAO”, sendo a parte YANG formada por enzimas oxidantes, metais de transição e radiações que recebem elétrons e a parte YIN formada por componentes redutores, antioxidantes endógenos e da dieta que doam equivalentes redutores (ou seja, elétrons) com o envolvimento de alvos oxidáveis específicos. Entre esses três componentes ocorrem as reações redox que envolvem a troca de elétrons, coordenada por processos de identificação, sinalização e defesa. A realização desses processos de forma harmônica representa um tipo de estresse oxidativo natural, fisiológico, denominado eu-estresse oxidativo. Porém, a disfunção do TAO desencadeia um estresse oxidativo excessivo e tóxico e o organismo entra em um estado deletério denominado di-estresse oxidativo (NIKI, 2016; SIES, 2019).

O desenvolvimento do di-estresse a partir do eu-estresse pode acontecer por várias razões, dentre elas, sobrecarga de oxigênio (por exemplo, devido à realização de exercício aeróbico extenuante) nas mitocôndrias e consequente aumento da produção de ROS, formação de espécies reativas de leucócitos polimorfonucleares estimulados, que podem atingir não apenas bactérias, mas também tecidos; desintoxicação de paracetamol em microssomas podem aumentar a produção hepática de ROS; reperfusão após isquemia pode levar a produção de espécies reativas de oxigênio devido à ativação da xantina oxidase (CALIRI; TOMMASI; BESARATINIA, 2021; TAFURI et al., 2016).

De qualquer forma, uma vez estabelecida, a condição de di-estresse oxidativo quase sempre representa um fenômeno indesejável, em termos de prevenção, curso, complicações, resultados, sensibilidade aos tratamentos e, em última análise, em termos de prognóstico. Uma vez que esta condição pode acarretar desde comprometimento da sinalização celular até a apoptose ou necrose (**Figura 6**) (SIES, 2019).

O di-estresse oxidativo não é uma doença, no sentido clássico do termo, mas sim um fator emergente de risco à saúde que, infelizmente, não dá origem a nenhum quadro clínico específico; seus sintomas ou sinais, de fato, são obscurecidos pelas doenças subjacentes às quais está associado, pelo menos a cem, incluindo câncer (**Figura 7**) (HAJAM et al., 2022; LEYANE; JERE; HOURELD, 2022).

2.2 Espécies reativas de oxigênio e espécies não radicais

Os radicais livres desempenham um papel fundamental na atividade metabólica e função de diferentes órgãos atuando como moléculas sinalizadoras. Sendo espécies químicas com um elétron desemparelhado e, portanto, potencialmente instáveis, tendem a neutralizar reagindo com outras substâncias, causando oxidação (ALI et al., 2020; TAFURI et al., 2016).

Através do metabolismo celular, principalmente o metabolismo aeróbico, é que serão produzidas a maior parte das espécies oxidantes. Os organismos aeróbicos precisam do dióxido de oxigênio (O_2) comoceptor de elétrons durante a oxidação de substratos energéticos. Paradoxalmente o O_2 acaba sendo uma ameaça celular pois através da sua redução serão formados as principais espécies oxidantes (GULCIN, 2020).

É importante ressaltar que nem todas as espécies oxidantes apresentam a característica de ser um radical livre, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2), mas por apresentarem potencial oxidante e promover a formação de radicais altamente reativos, essas substâncias são caracterizadas também como espécies reativas (ALI et al., 2020; BIRBEN et al., 2012; TAFURI et al., 2016).

As espécies reativas podem ser classificadas de acordo com a natureza do átomo que possui o orbital com elétron sozinho, podendo existir moléculas derivadas do oxigênio, nitrogênio, cloro, enxofre dentre outras. As espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS) são as três principais classes de oxidantes formados no corpo (ALI et al., 2020; GULCIN, 2020), exemplos de substâncias dessas categorias estão ilustradas na **figura 8**.

As principais ROS são os radicais livres superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radicais hidroxila (HO^{\cdot}). Já entre os oxidantes não-radical temos o H_2O_2 e o ácido hipocloroso ($HOCl$). E os principais RNS temos o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e peroxinitrito ($ONOO^-$), e entre os RSS o radical tiil (RS^{\cdot}). O principal alvo desses oxidantes são biomoléculas como ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios e proteínas (BIRBEN et al., 2012) (**Figura 9**).

Conforme apresentado na **figura 10**, no decorrer do metabolismo celular, a maior parte do oxigênio molecular (98-99%) tende a receber elétrons em pares. A porcentagem restante (1-3%) recebe elétrons individuais, ou seja, um de cada vez. O primeiro produto gerado, nestes casos, é o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Na cadeia respiratória mitocondrial, a transferência de elétrons individuais para o oxigênio molecular gera, após o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e, por fim, o radical hidroxila (GULCIN, 2020). O ânion superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de $O_2^{\cdot-}$ (seja enzimático, fagocítico ou químico) (HAJAM et al., 2022).

O radical hidroxila é considerado um radical livre altamente reativo e potencialmente prejudicial as células, uma vez que consegue se combinar rapidamente com metais ou outros radicais no próprio local onde foi produzido, promovendo modificação nas biomoléculas ao seu entorno. Assim, se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA (ALI et al., 2020).

O radical hidroxila pode ser formado ocasionalmente como produto da ação do sistema imune. A micróglia e os macrófagos geram mais frequentemente este composto quando exposto a patógenos muito específicos e certas bactérias. A ação destrutiva de OH^{\cdot} foi implicado em várias doenças autoimunes neurológicas quando células imunes se tornam superativadas e tóxicas para as células vizinhas saudáveis. A alta reatividade deste composto implica em uma reação imediata no local onde ele é formado (ALI et al., 2020; GULCIN, 2020).

Embora não seja um radical livre nem uma espécie química particularmente reativa (funciona, de fato, como uma molécula sinalizadora), o peróxido de hidrogênio pode se tornar um composto extremamente deletério, uma vez que, participa da reação que produz o OH·, a reação de Fenton (**Figura 11**). Esta é uma reação na qual o ferro no estado ferroso (Fe²⁺) é oxidado em ferro no estado férrico (Fe³⁺) por peróxido de hidrogênio, H₂O₂, o qual é por sua vez reduzido ao íon hidroxila e ao radical hidroxila (equação 1).

Outra reação associada a formação de radicais reativos através do H₂O₂ é a reação de Haber–Weiss que gera OH· a partir de H₂O₂ e superóxido O₂^{·-} catalisado por íons de ferro (equação 1).



(Equação 1 – Reação de Haber–Weiss)

Já é provado que estas duas reações são as principais fontes de radicais responsáveis pelo di-estresse oxidativo e dano celular (ALI et al., 2020; GULCIN, 2020).

Outro composto que não é um radical livre, mas é considerado uma espécie reativa, é a forma excitada do oxigênio molecular, o oxigênio singleto. Esta espécie pode reagir com múltiplos componentes celulares, preferencialmente compostos com dupla ligação, como os ácidos graxos poli-insaturados e a base nitrogenada guanina da molécula de DNA. As formas de interação do ¹O₂ com biomoléculas incluem: reações químicas ou transferindo sua energia de excitação para as moléculas e retornando ao estado fundamental (DI MASCIO et al., 2019). Apesar do seu importante papel, os efeitos biológicos do ¹O₂ não estão totalmente esclarecidos, mas estudos indicam associação desta molécula ao dano da pele induzido por radiação ultravioleta e pelo efeito citotóxico na terapia fotodinâmica (HOMMA; KOBAYASHI; FUJII, 2019).

Os efeitos deletérios das espécies reativas ocorrem como resultado das alterações de biomoléculas orgânicas, como a dos ácidos graxos poli-insaturados de membrana, oxidação de proteínas, quebra de fita de DNA, oxidação de RNA (ácido ribonucleico), danos mitocondriais e apoptose. Em condições normais, as espécies reativas são neutralizadas pelos antioxidantes que são capazes de

reagir diretamente com oxidantes para reduzir sua capacidade oxidação. Porém, em situações específicas, o estado redox pode ser alterado e as ações deletérias das espécies oxidantes podem sobressair causando assim danos no organismo (JAKUBCZYK et al., 2020).

Apesar dos potenciais efeitos deletérios promovidos pelas espécies oxidantes, é importante salientar que estas são principalmente moléculas sinalizadoras e sua existência é necessária para inúmeros mecanismos fisiológicos dos organismos vivos. Essas moléculas biologicamente hiperativas atuam como agentes de sinalização em vias celulares conhecidas como "sinalização redox". Dentre os mecanismos de ação, as moléculas reativas induzem a diferenciação celular e a apoptose, contribuindo assim para o processo natural de envelhecimento. Também participam das contrações musculares, regulação do tônus vascular e determinam a atividade bactericida e bacteriostática (JAKUBCZYK et al., 2020). Os H_2O_2 e $ONOO^-$, em particular, estão implicados em inúmeras cascatas de sinalização celular e devido à sua estrutura não radical, essas moléculas têm uma meia-vida relativamente mais longa do que quase todos os outros oxidantes, permitindo que eles migrem para longe seus locais de produção e se difundam através das membranas. Algumas evidências também sugerem que o H_2O_2 está envolvido na transdução de sinal regulando a expressão de genes através do fator nuclear e vias da apoproteína-1 (SEN; PACKER, 1996).

2.3 Antioxidantes

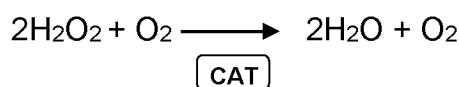
Antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixa concentração em relação aos de um substrato oxidável, retardam ou impedem a oxidação do mesmo substrato. Sua principal função é neutralizar os radicais livres nas células biológicas, para que estes consigam desempenhar suas ações de forma segura e não deletéria. Atuam inibindo a reação em cadeia de oxidação, agindo como doadores de hidrogênio ou aceitadores de radicais livres, gerando radicais mais estáveis. Numerosos estudos mostram que os antioxidantes desempenham um papel essencial na manutenção saúde, prevenindo e tratando doenças, devido à sua capacidade de controlar o estresse oxidativo (ALI et al., 2020; GULCIN, 2020; SINDHI et al., 2013).

Moléculas com propriedades antioxidantes podem ser produzidas endogenamente ou ingeridas exogenamente através dieta ou pelo uso de suplementos alimentares (**Figura 12**). Podem ter origem enzimática ou não, e são capazes de exercer sua ação tanto intra quanto extracelularmente (**Figura 13**).

As principais enzimas antioxidantes endógenas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já os principais antioxidantes não enzimáticos temos as vitaminas B, E e C, carotenóides, carnitina, cisteína, alguns metais, taurina e albumina (ALI et al., 2020; GUPTA et al., 2014). A heterogeneidade química de algumas espécies antioxidantes pode ser observada na (**Figura 14**).

A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 . Pode ser encontrada nas formas intracelular no citosol e nas mitocôndrias, e também extracelular (**Figura 15**). A SOD é classificada nas famílias: cobre-zinco SOD (Cu-Zn-SOD), manganês SOD (Mn-SOD), ferro-SOD (Fe-SOD) cada uma destas, presentes em diferentes locais no organismo. Dentre estas a Cu-Zn-SOD é conhecida por fornecer uma forte defesa contra a toxicidade do ânion superóxido intracelular, e de acordo com estudos, é aceito que ela é uma importante enzima para a vida aeróbica e é insubstituível (TAFURI et al., 2016).

A CAT está presente na maioria das células e catalisa a conversão de H_2O_2 em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O) e possui duas atividades enzimáticas dependendo da concentração de H_2O_2 . Se a concentração de H_2O_2 for alta, a CAT atua como catalase, isto é, remove H_2O_2 formando H_2O e O_2 (equação 2). No entanto, em baixos níveis de H_2O_2 e na presença de um hidrogênio doador adequado, por exemplo, de um etanol, metanol, fenol e outros, a catalase age peroxidicamente, removendo H_2O_2 , mas oxidando seu substrato (reação peroxidática) (ALI, et al., 2020).

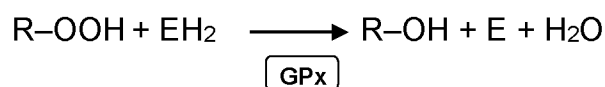


(Equação 2 – Reação catalisada pela enzima catalase)

Neste ponto de vista, sua principal função é controlar a ação do peróxido de hidrogênio, evitando assim seus efeitos colaterais indesejados. Esta enzima age principalmente no retículo endoplasmático, peroxissomos, mitocôndrias e citosol de muitos tipos de células como os eritrócitos e hepatócitos (ALI et al., 2020; TAFURI et al., 2016).

As glutathionas peroxidases são uma família de múltiplas isoenzimas que catalisam a redução de H₂O₂ ou hidroperóxidos orgânicos para H₂O e álcoois correspondentes utilizando glutathiona reduzida (GSH) como doadora de elétrons (MARGIS, 2008; BIRBEN et al., 2012). Desempenha uma função importante na proteção dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, onde funciona como um sistema de defesa antioxidante multicomponente (SINDHI et al., 2013).

A glutathiona peroxidase (GPx) é uma enzima ubíqua (E) que catalisa a redução de peróxidos (ROOH) a álcool (água para peróxido de hidrogênio), de acordo com a seguinte reação geral:



(Equação 3 – Reação geral catalisada pela enzima glutathiona peroxidase)

O mecanismo de ação da GPx requer glutathiona (GSH) como coenzima e selênio como cofator. É expressa em 8 diferentes isoformas, que variam entre si quanto a localização e especificidade ao substrato.

A atividade de SOD, CAT e GPx constituem a primeira linha de defesa antioxidante e desempenham um papel fundamental nos mecanismos de defesa total do sistema biológico, pois reagem com ROS para coordenar suas ações, para eliminá-los ou inibi-los (GULCIN, 2020; SINDHI et al., 2013).

Os antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria exógenos, incluem principalmente as vitaminas hidrossolúveis (vitamina C e algumas do complexo B) e lipossolúveis (vitamina A, vitamina E, beta-caroteno), os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio) e os derivados de plantas, os carotenóides e os polifenóis (MUNTEANU; APETREI, 2021).

O ácido ascórbico (vitamina C) é um antioxidante vital encontrado nas células e nos fluidos extracelulares necessários para as funções metabólicas normais do corpo. Como antioxidante atua na quebra de cadeia, neutralizando o superóxido, oxigênio singlete, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Impede que as macromoléculas como DNA, lipídios e proteínas sofram o dano oxidativo pela neutralização de espécies de oxigênio e nitrogênio. Além das funções de neutralização dos radicais livres, a vitamina C atua na restauração de pequenas moléculas como o α -tocoferol, GSH, urato e β -caroteno para que também possam atuar como antioxidantes (GULCIN, 2020).

A vitamina E é o termo genérico utilizado para um grupo de tocoferóis (α , β , γ , δ) e tocotrienóis (α , β , γ , δ) que são compostos lipossolúveis. Destes, o α -tocoferol e γ -tocotrienol, apresentam maior atividade biológica e antioxidante sendo encontrados em maior concentração nos tecidos e no plasma. O α -tocoferol é o único antioxidante lipossolúvel capaz de quebrar a reação radicálica a cadeia e atua protegendo a integridade das estruturas lipídicas, principalmente das membranas (GULCIN, 2020). De uma maneira geral, a vitamina E atua neutralizando o H_2O_2 e extingue os radicais livres, interrompendo ligações em cadeia que desenvolvem peroxidação lipídica, protegendo assim as membranas do dano oxidativo (ALI et al., 2020).

Uma classe de pigmentos naturais, os carotenoides, são sintetizados a partir de plantas e microrganismos, mas não animais. Eles estão presentes como microcomponentes em frutas e hortaliças e são responsáveis por suas cores (amarelo, laranja e vermelho) e pelos efeitos benéficos desses alimentos na prevenção de doenças crônicas degenerativas. Os principais carotenoides incluem os hidrocarbonetos licopeno, β -caroteno, e as xantofilas, com as luteína e zeaxantina. A ação antioxidante desses compostos ocorre essencialmente em ambientes lipofílicos, como membranas, devido sua natureza química hidrofóbica. São capazes de neutralizar o oxigênio singlete, efeito o qual a maioria dos outros fenólicos e antioxidantes são relativamente ineficazes (GULCIN, 2020; TAFURI et al., 2016).

Os polifenóis são micronutrientes abundantes na dieta e importantes na prevenção de doenças degenerativas. Entre os polifenóis, isoflavonas e ácido gálico são os mais absorvidos pelos humanos, com diferentes cinéticas, e os

flavonoides, catequinas e glicosídeos de quercetina. Menos absorvidos são os polifenóis proantocianidinas e antocianinas (TAFURI et al., 2016).

A eficácia dos compostos antioxidantes depende de vários fatores, sendo os mais importantes: suas propriedades estruturais, a temperatura, as características do substrato suscetíveis à oxidação, concentração, juntamente com a presença compostos sinérgicos e o estado físico do sistema.

A estrutura química de um antioxidante determina sua reatividade intrínseca aos radicais livres e a outras ROS e, portanto, influencia atividade antioxidante. A eficiência dos antioxidantes também depende de sua concentração e localização no sistema, isto é, a sua distribuição de interface (GENCER et al., 2006). Outro fator que influencia sua ação protetora é a cinética da reação, que engloba a taxa de reação entre um antioxidante e um oxidante distinto, a termodinâmica da reação e a capacidade do antioxidante de reagir (BARRERA, 2012). Todos estes fatores devem ser levados em consideração ao considerar a eficiência e a seleção de uma substância antioxidante adequada para um uso particular.

2.4 Di-estresse oxidativo e doenças degenerativas

O di-estresse oxidativo desempenha um papel importante no processo e envelhecimento e no desenvolvimento de várias doenças, como, câncer, artrite, doenças autoimunes, cardiovasculares, pulmonares e doenças neurodegenerativas (HAJAM et al., 2022; ISLAM, 2017; LEYANE; JERE; HOURELD, 2022). A teoria dos radicais de oxigênio, desenvolvida por Harman (1956), propõe que o envelhecimento pode ser secundário ao estresse oxidativo, que leva a reações de oxidação lipídica, proteica, e com o DNA, que desencadeiam alterações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético (SHARIFI-RAD et al., 2020).

Com o avanço da idade, predisposição genética e fatores de risco ambientais, os mecanismos associados ao sistema redox podem ser prejudicados, e as espécies oxidativas podem atuar promovendo a nível celular modificações pós-traducionais e oxidação de biomoléculas, o que pode desencadear, dentre outros processos, mutações somáticas e transformações neoplásicas (REUTER et al., 2010).

Lipídios, DNA e proteínas são exemplos de moléculas que podem ser modificadas pelo excesso de ROS *in vivo*. Algumas dessas modificações são conhecidas por terem um efeito direto sobre a função de moléculas-alvo, como a inibição de uma função enzimática, já outras modificações apenas refletem o grau local de estresse oxidativo (MARROCCO; ALTIERI; PELUSO, 2017).

Uma faceta específica do estresse oxidativo e da inflamação é peroxidação lipídica (LPO), um processo complexo no qual espécies reativas atacam preferencialmente moléculas de ácidos graxos poli-insaturados, presentes por exemplo, na membrana celular. Os produtos primários da LPO são peróxidos ou hidroperóxidos instáveis que podem ser degradados em produtos secundários, incluindo hidrocarbonetos, álcoois, éter e aldeídos. A oxidação excessiva de lipídios, altera as propriedades físicas das membranas celulares e podem causar modificação covalente de proteínas e ácidos nucleicos, cofatores e vitaminas, influenciando sua estrutura e função (GASCHLER; STOCKWELL, 2017; MATTSON, 2009).

Devido a sua reatividade e da habilidade na geração de mensageiros secundários, os peróxidos lipídicos estão envolvidos na progressão e regulação da inflamação (FORMAN; URSINI; MAIORINO, 2014; MATTSON, 2009). A capacidade dos peróxidos lipídicos de gerar mensageiros secundários tóxicos, também ajudou a destacar sua importância em múltiplas patologias, dessa maneira, inúmeros estudos comprovaram a relação existente entre LPO e desenvolvimento de doenças degenerativas, como a obesidade, síndrome metabólica, Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, câncer e doenças cardiovasculares (PETROVIC et al., 2020).

A oxidação de componentes de DNA por ROS/RNS, como a oxidação de nucleotídeos, quebra de fita, perda de bases e formação de adutos, é a principal fonte de danos induzidos no DNA. O radical HO• pode reagir com todas as bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas), bem como com a desoxirribose, gerando diversos produtos, sendo o mais comum o 7,8-dihidroxi-8-oxo-2'-desoxiguanosina que pode ser mensurado através de cromatografia acoplada com espectroscopia de massa e ensaios comerciais de ELISA (MARROCCO; ALTIERI; PELUSO, 2017).

As proteínas representam também um amplo alvo para ROS e RNS gerados sob condições normais ou condições de estresse oxidativo. Vários resíduos de aminoácidos podem sofrer modificações oxidativas, como por exemplo, oxidação de resíduos contendo enxofre e nitratação de resíduos de tirosina. A oxidação de centros de ferro-enxofre pelo superóxido é irreversível e leva à inativação enzimática. Além disso, os metais ligados à proteína podem gerar, através da reação de Fenton, radicais HO• que oxidam rapidamente os resíduos de aminoácido da proteína vizinha. Se as modificações oxidativas dos resíduos de proteínas não forem devidamente reparados ou removidos, elas podem afetar a estrutura tridimensional e as propriedades físico-químicas da proteína que pode também se tornar tóxica (MARROCCO; ALTIERI; PELUSO, 2017).

Todos estes processos mediados pelo di-estresse oxidativo, podem resultar desde defeitos na sinalização celular como também, apoptose (morte celular programada) ou senescência celular (um estado de parada permanente do crescimento sem sofrer apoptose) (CALIRI; TOMMASI; BESARATINIA, 2021; TAFURI et al., 2016). Se uma célula sofre apoptose ou senescência, depende da gravidade do dano e do tipo de tecido; no entanto, ambos os eventos atuam como mecanismos de proteção para evitar a proliferação de células danificadas. Isto é, para evitar a instabilidade genômica e a propagação do dano induzido às células da progênie. No entanto, após a evasão da apoptose ou senescência, excesso de ROS e o di-estresse oxidativo na célula podem danificar ainda mais alvos macromoleculares, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. O dano induzido a essas macromoléculas é significativo, porque a manutenção da integridade do DNA/RNA, proteínas e lipídios é fundamental para determinar o estado de saúde versus doença (SIES, 2015).

Evidências acumuladas suportam um papel importante para o di-estresse oxidativo no desenvolvimento de uma variedade de doenças humanas, incluindo câncer. Como a instabilidade genômica é uma característica do câncer, as ROS que danificam o DNA são de especial importância na carcinogênese, neste caso as que merecem destaque são os $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HO\cdot$, 1O_2 sendo as duas últimas as mais relevantes, pois estas podem atacar e danificar diretamente o DNA (CALIRI; TOMMASI; BESARATINIA, 2021).

Outro agravante do di-estresse oxidativo é sua relação com a inflamação, processo este denominado oxi-inflamação (**Figura 16**). Vários são os mecanismos que interrelacionam esses dois processos, dentre eles estão os danos oxidativos a alvos celulares e subcelulares, que podem desencadear uma resposta inflamatória, que envolve, entre outras, a produção de ROS e que inicia uma cascata de eventos intrincada e inter-relacionada (MERELLI et al., 2021).

O desencadeamento da resposta inflamatória resulta na migração de neutrófilos para o local do dano tecidual. Essas e outras células inflamatórias liberam ROS para combater patógenos estranhos no local da lesão e ajudar a restaurar o tecido danificado. No entanto, as ROS liberadas podem desencadear ações não intencionais, além de terem efeitos benéficos. Mais especificamente, enquanto as ROS liberadas auxiliam na restauração do tecido, elas também podem elevar a carga do estresse oxidativo e potencialmente danificar macromoléculas cruciais. Assim, em um esforço para neutralizar o dano oxidativo, as células envolvidas na resposta imune podem realmente causar mais danos. Isso cria um ciclo vicioso no qual o estresse oxidativo causa inflamação, o que, por sua vez, resulta em geração adicional de ROS e dano oxidativo potencialmente aumentado a alvos macromoleculares que podem levar ao desenvolvimento de doenças, incluindo vários tipos de malignidade (CALIRI; TOMMASI; BESARATINIA, 2021; LEYANE; JERE; HOURELD, 2022; MERELLI et al., 2021; REUTER et al., 2010).

O surgimento da aterosclerose é um exemplo de doença em que a oxi-inflamação se faz presente. Segundo Silva e colaboradores (2011), a hipótese de modificação oxidativa da aterogênese sugere que metabólitos do oxigênio contribuem para a progressão do processo aterosclerótico, modificando oxidativamente as lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A ativação das células inflamatórias resulta no aumento dos leucócitos no sangue, o que favorece a aterogênese, promovendo a oxidação do LDL. Além disso, é razoável que o aumento da regulação dos sistemas antioxidantes desencadeie um contínuo processo inflamatório, o que conduz a uma diminuição na capacidade antioxidante (DA COSTA SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011).

Outras doenças metabólicas, neurodegenerativas e cardiovasculares estão relacionadas ao estresse oxidativo e a inflamação. A hipertensão, por exemplo, a

angiotensina II estimula a produção de ânion superóxido da enzima NADPH oxidase levando o aumento na produção de ROS. Esse desbalanço oxidativo pode ativar uma série de respostas inflamatórias importantes no sistema cardiovascular, aumentando a resposta imune adaptativa, e conseqüentemente lesionando os tecidos e órgãos, podendo causar morte celular (VELLOSA et al., 2021).

O câncer é uma doença em que a oxi-inflamação pode estar relacionada tanto com o surgimento, progressão e tratamento da doença. Um exemplo desse processo, é a ação integrada da inflamação crônica e o di-estresse oxidativo em um tecido, ocasionando assim lesão. O tecido lesionado pode ativar células tronco progenitoras para regeneração, e estas células podem sofrer danos através das ROS/RNS e as mutações resultantes desse processo podem se acumular, o que pode gerar células-tronco cancerígenas (MURATA, 2018).

Estes são exemplos que demonstram que a disfunção redox associada a inflamação, na maior parte das vezes, pode ser ao mesmo tempo causa e consequência de patologias humanas associadas ao di-estresse oxidativo.

3. Avaliação do estado redox

3.1 Considerações gerais

A quantificação direta de ROS/RNS é uma ferramenta valiosa que pode refletir tanto o processo da saúde e da doença, como também das respostas farmacológicas às terapias realizadas. No entanto, dada a meia-vida curta dessas espécies e suas baixas concentrações, a medição em sistemas biológicos é uma tarefa complexa (MARROCCO; ALTIERI; PELUSO, 2017). Apesar disso, a investigação de métodos e instrumentos para avaliar o estado redox têm apresentado progresso notável nas últimas décadas (MUNTEANU; APETREI, 2021).

As principais abordagens de análise direta das espécies reativas incluem: ressonância de spin eletrônico, ressonância magnética de fluorescência, e técnicas de espectrometria de massa (MARROCCO; ALTIERI; PELUSO, 2017). Apesar de serem bastante precisas, estes são métodos de mensuração complexos, que necessitam de equipamentos rebuscados, o que se torna inviável seu uso na prática clínica (LUBRANO et al., 2002).

Além da medida da produção de radicais livres, uma outra estratégia bastante utilizada para avaliação do estresse oxidativo é a medição de marcadores estáveis em fluidos corporais, que podem refletir um estresse oxidativo sistêmico ou específico do tecido. Neste sentido, uma das formas de avaliação do estado redox é através da mensuração da capacidade do sistema antioxidante atuar neutralizando a produção de radicais livres. Dentre os métodos disponíveis para esta análise, os mais empregados são a mensuração de enzimas antioxidantes no plasma, e os métodos de avaliação da capacidade antioxidante total, atribuída a dosagem dos antioxidantes não enzimáticos em fluidos corporais (IVANOVA; GERASIMOVA; GAZIZULLINA, 2020; MUNTEANU; APETREI, 2021).

Os principais fluidos utilizados para análise dos marcadores do estado redox são sangue e urina (IORIO; AMUSO, 2017). Existem também outros métodos validados que utilizam amostras não invasivas, como saliva e a respiração exalada. Independente do fluido analisado, os fatores que devem ser levados em consideração na escolha do método para análise são a confiabilidade, características dos sujeitos que serão avaliados e melhor custo-benefício (TAFURI, S., COCCHIA, N., LANDOLFI, F., IORIO, E. L., & CIANI, 2016).

Os avanços em pesquisa de novas ferramentas para avaliação do estado redox e diagnóstico do estresse oxidativo desencadearam o surgimento no ano de 2008 de um novo campo de estudo na “bioquímica aplicada” e no “diagnóstico molecular” denominada REDOXÔMICA. Trata-se assim de uma área de estudo que visa conhecimento aprofundado do sistema redox humano, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, basal ou após algum estímulo ou intervenção. Com este intuito de investigação, um dos principais objetivos da redoxômica é a identificação e validação de métodos adequados de análise do estado redox *in vivo* ou *ex-vivo*, conforme mostrado na **figura 17** (IORIO EL, 2008). Avaliar e monitorar biomarcadores de estresse oxidativo ao longo do tempo, pode ser um suporte considerável para a abordagem médica convencional para os indivíduos em risco de câncer e que sofrem de câncer.

Assim, no contexto da relevância do di-estresse oxidativo para o desenvolvimento e agravamento de inúmeras doenças, a investigação de formas de mensuração dos marcadores do estado redox mais simples e ao mesmo

tempo confiáveis é de importância imensurável. Uma vez que, o grande problema da maioria dos métodos de análise existentes inclui: a necessidade equipamentos caros, de profissionais altamente especializados, a execução de protocolos complexos, e a alta instabilidade dos radicais livres (MARROCCO; ALTIERI; PELUSO, 2017). Esses fatores contribuem para uma grande dificuldade de monitoração rotineira do estado redox na prática, o que poderia trazer enormes benefícios tanto na avaliação da saúde, quanto na verificação do progresso de intervenções terapêuticas.

A partir das últimas duas ou três décadas, diferentes abordagens tornaram-se disponíveis, algumas delas podem ser realizadas em laboratórios de análises comuns ou, ainda, no leito do paciente, por meio de instrumentos analíticos dedicados, como, por exemplo, fotômetros portáteis com minis centrífugas incorporadas capazes de separar o componente corpuscular do sangue do plasma, usado como amostra biológica. Apropriadamente calibrados, e submetidos a rigorosos programas de avaliação de qualidade de desempenho (externa e interna), esses instrumentos analíticos provaram ser confiáveis na determinação do status redox de várias espécies animais e de seres humanos, saudáveis ou afetados por doenças relacionadas ao di-estresse oxidativo.

Neste sentido, as avaliações analíticas baseadas no uso de fotômetros, juntamente com centrífugas, devido à sua relação custo/benefício favorável, estão gradualmente se difundindo em muitos países, facilitando a transposição da pesquisa básica sobre estresse oxidativo na prática clínica (PALMIERI; SBLENDORIO, 2007; RIMBACH et al., 1999; YIN, 2008). Claro que nem todos os testes propostos para medir o estresse oxidativo são igualmente válidos. O teste ideal deve ter alguns requisitos específicos (IORIO EL, 2008).

Em primeiro lugar, o teste ideal para medir o estresse oxidativo na prática clínica deve ser validado por meio de procedimentos padrão-ouro (IORIO, 2005; LEMINEUR; DEBY-DUPONT; PREISER, 2006) . Em outras palavras, um método destinado a detectar indiretamente o nível de radicais livres deve ser validado pela abordagem de espectrometria de ressonância de spin eletrônico paramagnético.

Em segundo lugar, o teste ideal deve ser capaz de medir adequadamente o status redox na população em estudo. É obrigatório fornecer evidências sobre

seus valores de referência em uma população humana, e eventuais variações relacionadas a parâmetros (para)fisiológicos, incluindo sexo, idade, gravidez e assim por diante. Neste contexto, o teste deve ser capaz de discriminar pessoas normais (com função redox ótima presumida) de pessoas que sofrem de condições ou doenças relacionadas ao estresse oxidativo: por exemplo, o teste deve ser suficientemente sensível para detectar o aumento esperado do nível de oxidantes após a exposição ao oxigênio hiperbárico, como também fornecer dados sobre o nível e o grau de estresse oxidativo (PALMIERI; SBLENDORIO, 2007).

Em terceiro lugar, o teste ideal deve fornecer informações confiáveis sobre alterações redox antes do aparecimento ou pelo menos em um estágio inicial da doença relacionada ao estresse oxidativo presumido (valor preditivo). Possivelmente, deve ser capaz de i) antecipar a progressão da doença durante um acompanhamento sistemático e ii) sofrer, com sensibilidade adequada, alterações significativas após tratamentos médicos/cirúrgicos/antioxidantes. Por exemplo, o nível de oxidantes deve diminuir e/ou o nível de antioxidante deve aumentar após um tratamento antioxidante (TAFURI, S., COCCHIA, N., LANDOLFI, F., IORIO, E. L., & CIANI, 2016).

Levando estes fatores em consideração, como também estabelecer as indicações clínicas concretas para o tratamento antioxidante e evitar concomitantemente os efeitos colaterais indesejados de suplementos desnecessários, há alguns anos o pesquisador italiano Mauro Carratelli desenvolveu dois testes para avaliar o estado redox que entraram na rotina clínica e foi difundida com sucesso na Itália e em outros países (ABERTI, A., BOLOGNINI, L., CARRATELLI, M., DELLA BONA, M. A., & MACCIANTELLI, 1997; ALBERTI et al., 2000; DOHI et al., 2005).

O primeiro teste é o de metabólitos reativos do oxigênio (d-ROMs), que objetiva avaliar com precisão e facilidade a capacidade oxidante total em amostras biológicas (geralmente plasma) em humanos ou animais. E o segundo teste, capacidade antioxidante total (BAP), que se baseia na capacidade de uma amostra de plasma de sangue de reduzir íons férricos a íons ferrosos como um ensaio FRAP (capacidade de redução férrica do plasma) (BENZIE; STRAIN, 1996) (**Figura 18**). No entanto, comparado ao ensaio FRAP clássico descrito pela

primeira vez por Benzie, o teste BAP é mais rápido e mais simples de executar. Além disso, o teste BAP mostrou-se capaz de integrar os resultados do teste d-ROMs, de acordo com o novo conceito de avaliação global do estresse oxidativo (IORIO, 2010).

3.2 Avaliação da capacidade oxidante total do plasma (d-ROMs test).

O teste d-ROMs explora as propriedades cromogênicas de uma amina aromática, mais especificamente, da N,N-dietilparafenilenodiamina (DPPD) para avaliar a capacidade oxidante. Tal composto, em seu estado químico salino de base aromática, dissolvido em água, dá origem a uma solução incolor e transparente. No entanto, quando espécies oxidantes são adicionadas, ele dá-lhes facilmente seus elétrons, fazendo com que a cor da solução fique rosa-avermelhada. O teste pode ser realizado utilizando amostra de soro ou plasma (IORIO, 2005).

De acordo com o método cinético, 10 microlitros (μL) da amostra de sangue será misturada com 10 μL de substrato cromogênico (DPPD - reagente 1, R₁, do kit) e 1 mL de tampão ácido (pH 4,8 - R₂, do kit). Na presença de ferro, emitido pelas proteínas plasmáticas através tampão ácido, são produzidos radicais alcoxila e peroxila, de acordo com a reação de Fenton. Tais radicais, são capazes de oxidar a DPPD produzindo assim um derivado cor de rosa que é fotometricamente quantificado à 505 nanômetros (nm). Um reagente branco e um padrão, obtido pela substituição do soro por água destilada, ou um soro com valor atribuído, respectivamente, devem ser incluídos para cada série de ensaios. Todas as soluções devem ser delicadamente misturadas e após 1 min de incubação à 37 °C podem sofrer a leitura fotométrica, medindo sua absorvância imediatamente e após 1, 2 e 3 min. Em seguida, a absorção valor do branco do reagente deve ser subtraído do padrão e das amostras (IORIO, 2005). Uma observação importante: embora o teste de d-ROMs seja frequentemente descrito como um teste para medição de metabólitos reativos de oxigênio e embora muitos autores relatem que ele mede as partículas alcoxil e peroxil geradas por hidroperóxidos circulantes, ele deve realmente ser entendido como uma medição de capacidade oxidante total do plasma, para a qual contribuem outras atividades oxidantes enzimáticas e não enzimáticas (ALBERTI et al., 2000) .

É possível converter essa “capacidade” oxidante em um número, através do qual o resultado do teste de d-ROMs pode ser expresso. Na população normal, aparentemente saudável, o valor do teste de d-ROMs varia de 250 a 300 Unidade Carratelli, (U CARR), do nome do químico italiano criador do método (IORIO, 2005). No entanto, como esta unidade de medida não é reconhecida pelos órgãos internacionais de normalização, sugere-se fortemente substituí-la pela de "unidade oxidante" (U. O.). Um valor superior a 300 U.O. sugere uma produção de espécies oxidantes além da norma e, portanto, uma condição de di-estresse oxidativo por "excesso de oxidação".

O teste de d-ROMs provou ser um teste altamente confiável para ser utilizado na rotina clínica, pois foi validado experimentalmente utilizando o método de ressonância de spin eletrônico, considerado padrão ouro para mensuração de espécies oxidativas (ALBERTI et al., 2000). Apresenta grandes vantagens como a simplicidade e facilidade na análise, como também, na rapidez de obtenção dos resultados. Além disso, não exige qualquer pré-tratamento da amostra que será analisada, e requer uma instrumentação simples para detecção, sendo necessário apenas um fotômetro e uma centrífuga, equipamentos comumente disponíveis em qualquer laboratório (VASSALLE et al., 2006).

Além disso, em comparação com outros testes comumente disponíveis para avaliar o estresse oxidativo, d-ROMs foi provado ser altamente confiável (IORIO, 2005; TROTTI; CARRATELLI; BARBIERI, 2002) . Portanto, o teste de d-ROMs está perfeitamente integrado no quadro atual de avaliação do estresse oxidativo. Desde seu desenvolvimento na Itália, o teste d-ROMs passou a ser utilizado em inúmeros ensaios clínicos e pesquisas envolvendo estresse oxidativo. Foi amplamente usado em países europeus e no Japão (BOAKYE et al., 2020; FILIOPOULOS et al., 2008; FUKUI et al., 2011; GÀO et al., 2019; YALE et al., 2016), mas, no Brasil, poucos estudos foram desenvolvidos e infelizmente não é um método muito conhecido.

3.3 Avaliação da capacidade antioxidante total do plasma (BAP test).

A avaliação da capacidade antioxidante no plasma pode ser mensurada através do teste BAP. Trata-se de um teste que mensura a capacidade dos

antioxidantes plasmáticos em reduzir íons férricos (Fe^{3+}) ligados a um substrato cromogênico em íons ferrosos (Fe^{2+}). A intensidade da descoloração do substrato cromogênico é determinada fotometricamente usando um comprimento de onda de 505 nm e resulta proporcional à capacidade do plasma em reduzir íons férricos (KIM et al., 2014).

Para a realização do teste BAP mais precisamente 10 μL de plasma sanguíneo deverá ser dissolvido em uma solução corada, que foi obtida previamente obtida de uma fonte de íons férricos (cloreto férrico, FeCl_3 , o reagente 2, R_2 , do kit) com um substrato cromogênico especial (um derivado de tiocianato, o reagente 1, R_1 , do kit). Após uma curta incubação (5 min), a 37°C , tal solução irá descolorir e a intensidade desta mudança cromática será diretamente proporcional à capacidade do plasma de reduzir, durante a incubação, íons férricos (inicialmente responsável pela cor da solução) a íons ferrosos. A intensidade desta descoloração é determinada fotometricamente usando um comprimento de onda de 505 nm. Os resultados obtidos são avaliados como $\mu\text{mol/L}$ ou íons férricos reduzidos (IORIO, 2010; TAFURI, S., COCCHIA, N., LANDOLFI, F., IORIO, E. L., & CIANI, 2016).

Com base nos níveis de referência existentes na literatura, uma capacidade antioxidante de $< 2.000 \mu\text{mol/L}$ é considerado uma redução na capacidade antioxidante plasmática sendo assim identificado o di-estresse oxidativo (KIM, 2018).

Estudos previamente realizados com o teste BAP comprovaram que este é capaz de mensurar no plasma os antioxidantes ácido úrico, ácido ascórbico, bilirrubina e α -tocoferol. Sua validação, como a do d-ROMs, foi alcançada através de experimentos realizados com o spin eletrônico/paramagnético que é considerada a técnica “padrão ouro” para estudar radicais livres *ex vivo* (IORIO, 2010).

A utilidade clínica do teste BAP em seres humanos foi demonstrada em vários estudos, seja em condições fisiológicas ou patológicas (ITO et al., 2012; KIM et al., 2014; KITAOKA et al., 2020; TAKAHASHI et al., 2021; TAKAYANAGI et al., 2020).

4. Considerações finais

As células normalmente geram espécies reativas de oxigênio durante seu metabolismo. Estas espécies em concentrações baixas ou moderadas desempenham importantes funções fisiológicas.

No entanto, um aumento excessivo de ROS em condições de di-estresse oxidativo pode ser muito prejudicial e está associado ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer.

Um dos maiores desafios na identificação do di-estresse oxidativo está nos métodos de detecção. Assim, a utilização de métodos seguros, simples e adequados para dosagens das espécies oxidativas e antioxidantes é de grande valia no contexto clínico, uma vez que estes testes podem ser realizados com maior facilidade, sendo possível acompanhar o estado redox do paciente em vários estágios, desde o diagnóstico e a progressão do tratamento.

Dessa forma, o segundo capítulo da presente dissertação apresentará um estudo no qual utilizou os testes d-ROMs e BAP para caracterização do estado redox de pacientes com câncer. Além disso, foi realizada a investigação de correlações destes parâmetros com variáveis hematológicas e bioquímicas.



Figura 1. A visão do câncer na Medicina Integrativa. [Eugenio Luigi Iorio e Clarissa Aires De Oliveira, original].

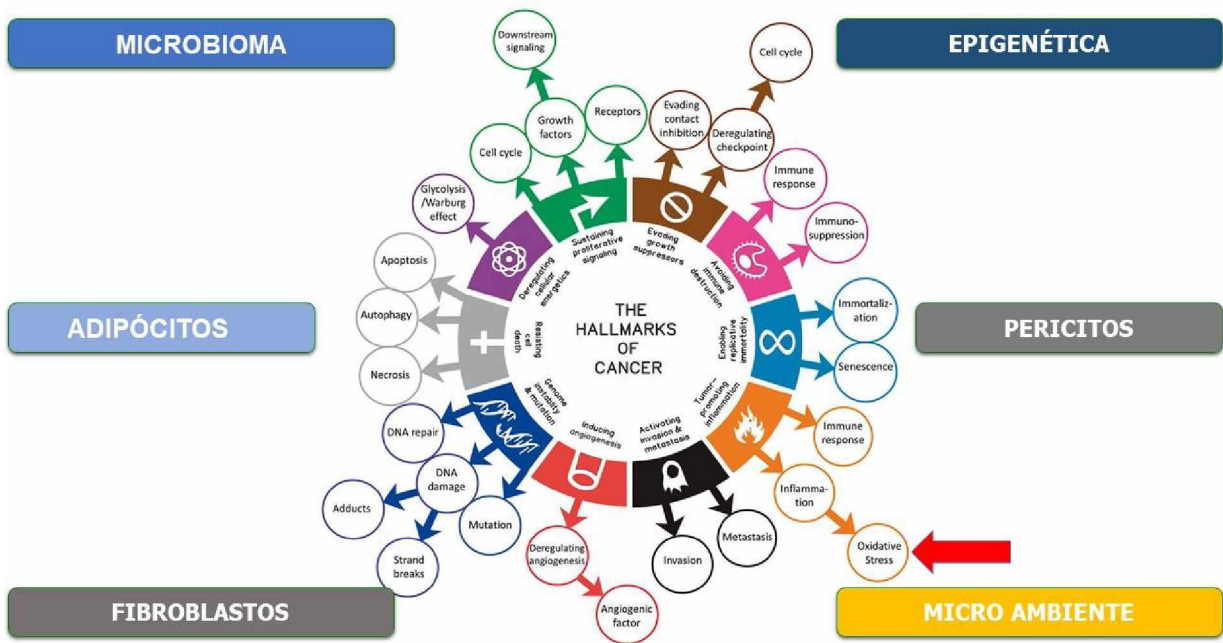


Figura 2. Hallmarks do câncer. Última revisão. [Modificado por Hanahan D. *Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov.* 2022. 12 (1): 31-46.]

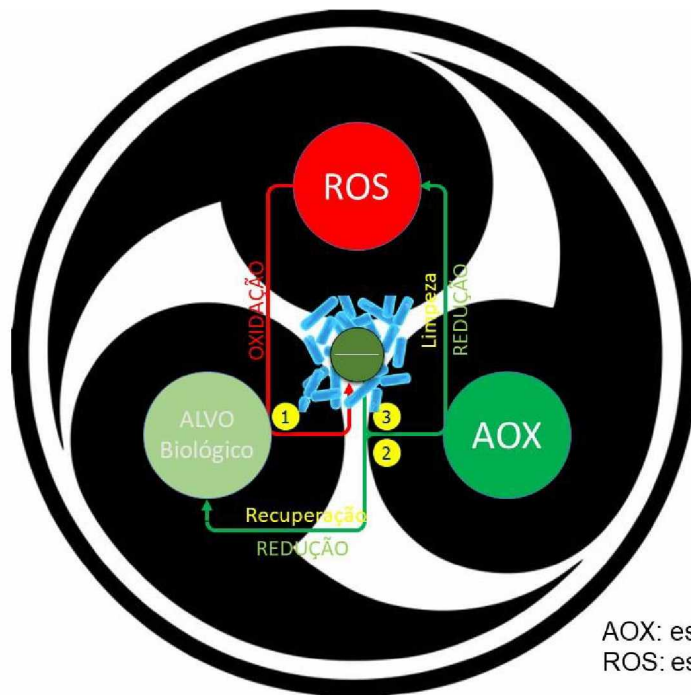


Figura 3. Mecanismo elementar de funcionamento do sistema redox. A espécie reativa oxidante (ROS, em vermelho) oxida a molécula alvo (em laranja), subtraindo dela um elétron (1); a modificação estrutural reversível consequente induz a ativação ou inibição de uma determinada função celular (por exemplo, a neutralização de substâncias tóxicas). A espécie redutora/antioxidante (AOX, em verde), devolve o elétron ao alvo molecular, devolvendo-o ao seu estado funcional inicial (2). Qualquer excesso de espécies reativas oxidantes é prontamente tamponado pela ação scavenger das espécies redutoras/antioxidantes (3). [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

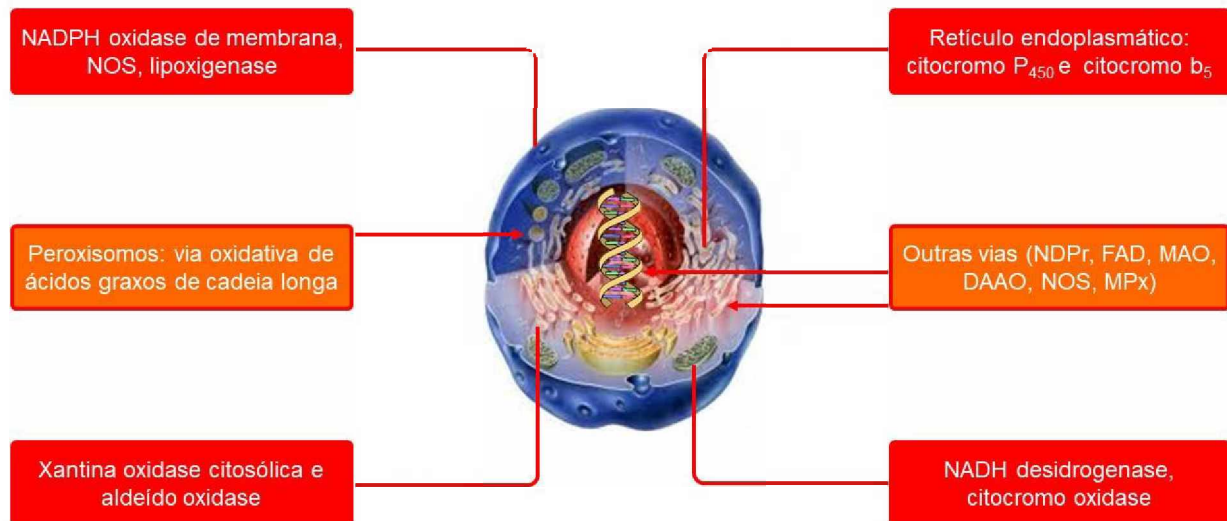


Figura 4. Mecanismo fisiológico de formação de espécies reativas oxidantes via enzimas, em relação às diferentes localizações celulares (membrana plasmática, citosol, organelas e núcleo). Abreviaturas: NDPr (Nucleotídeo difosfato redutase), FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina), MAO (mono amino oxidase), DAAO (diamino oxidase), NOS (óxido nítrico sintase), MPx (mieloperoxidase) [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

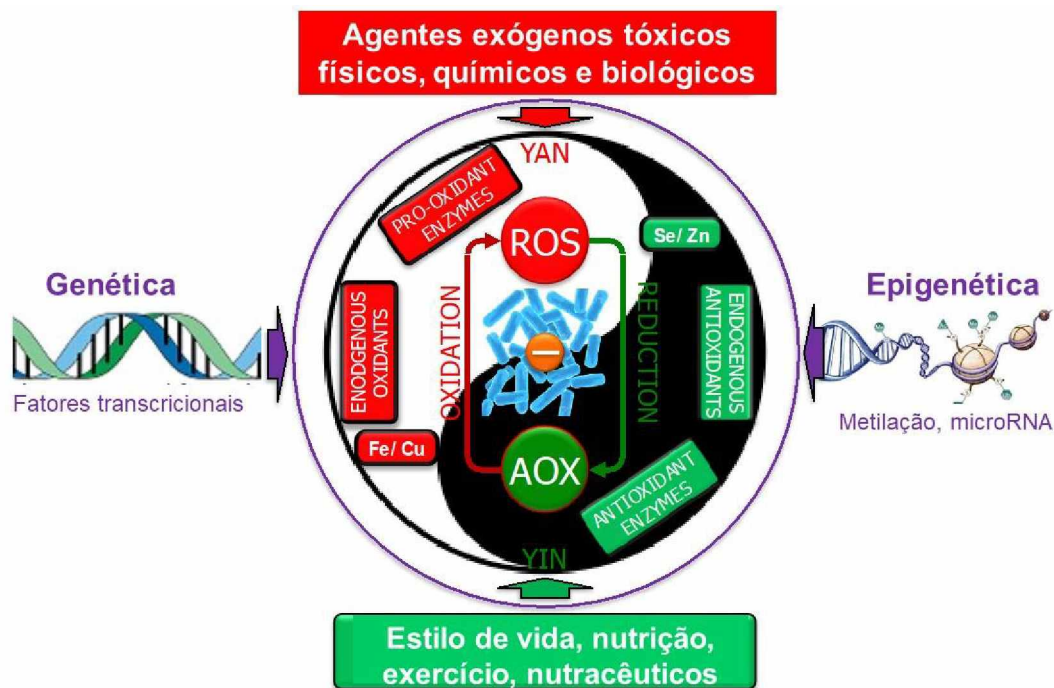


Figura 5. Representação esquemática do sistema redox (TAO REDOX). O sistema redox é um sistema bioquímico ubíquo composto por espécies reativas redutoras (YIN) e oxidantes (YAN) capazes de trocar elétrons, compartilhados entre os componentes eucarióticos e procarióticos do nosso organismo, já que o homem é um holobionte. O sistema redox reage a uma série de estímulos (indicados acima, em vermelho) processando respostas adaptativas (defesa, sinalização), que são influenciadas pela estrutura genética, estilo de vida e mecanismos epigenéticos. A função do sistema redox é gerenciar uma função adaptativa, essencial para a sobrevivência: o estresse oxidativo. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

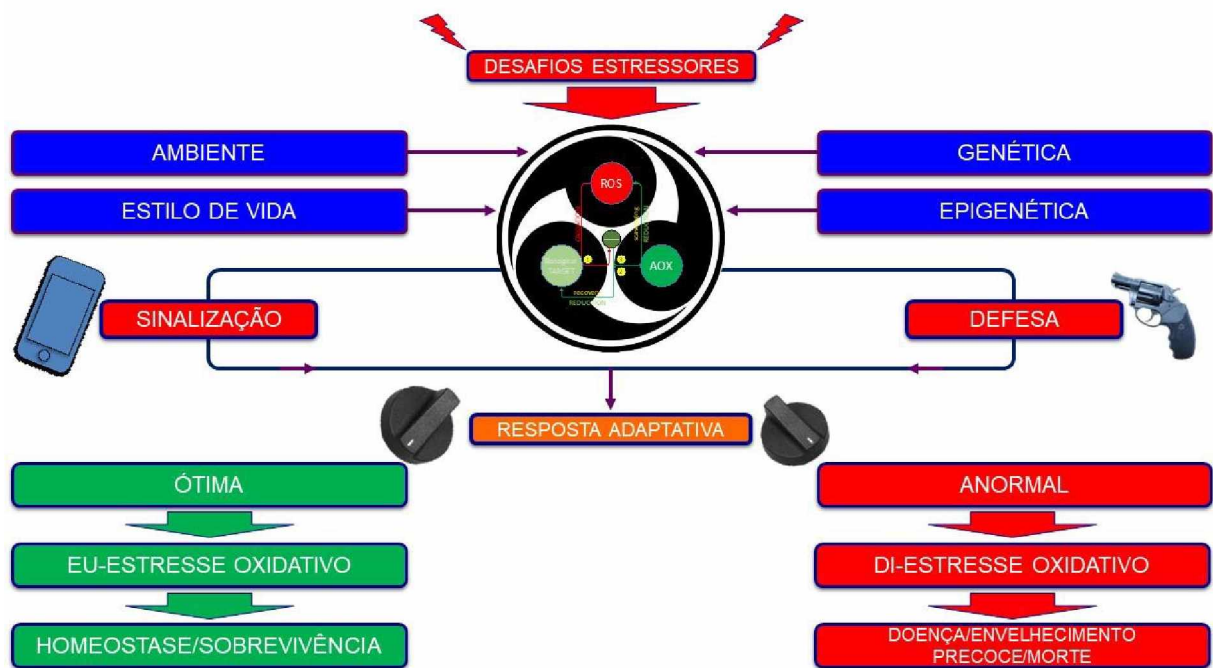


Figura 6. Sistema redox e estresse oxidativo. O sistema redox gerencia o estresse oxidativo, como uma resposta adaptativa a diferentes estressores. Sob o controle e/ou influência de uma série de fatores (ambiente, estilo de vida, genética, epigenética), o sistema redox explora a troca de elétrons entre espécies oxidantes, alvos moleculares e espécies redutoras, para ativar mecanismos de sinal (telefone celular) ou defesa (revólver). Se a resposta adaptativa for adequada (canto inferior esquerdo, verde), o efeito final será a manutenção da homeostase e, portanto, a sobrevivência (eu-estresse oxidativo). Se, por outro lado, a resposta adaptativa for anormal, ou, em qualquer caso, ineficiente (canto inferior direito, vermelho), o efeito final será a perda da homeostase, com possíveis resultados em doenças, envelhecimento prematuro e até morte (di-estresse oxidativo). [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

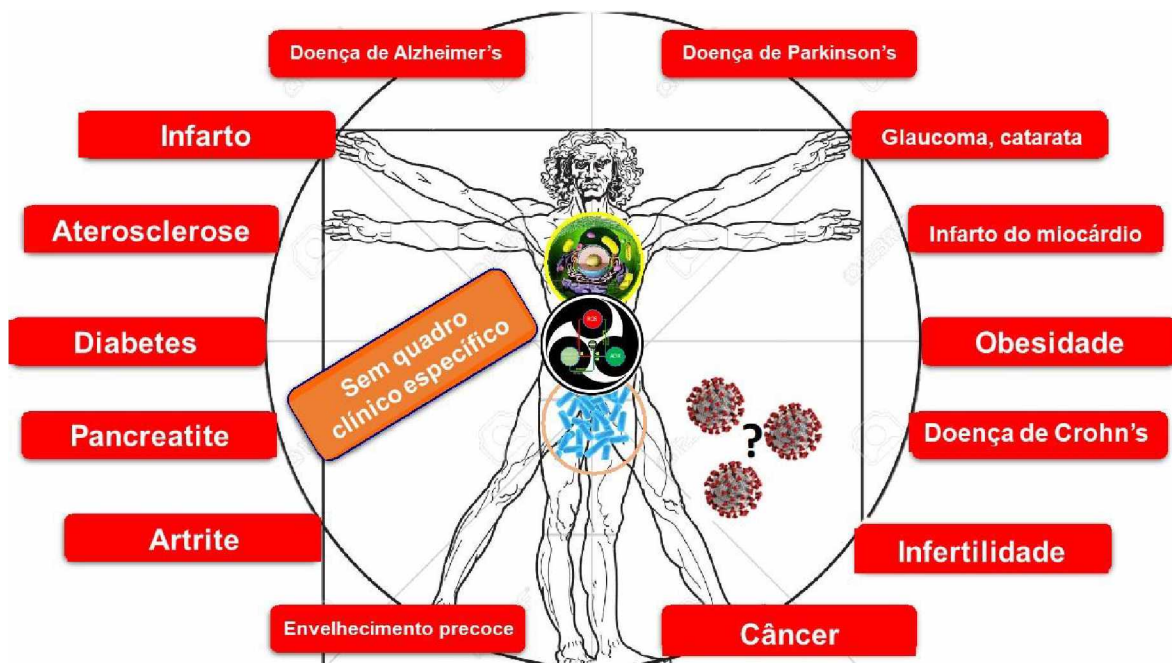






Figura 7. Representação esquemática das patologias associadas ao di-estresse oxidativo. No centro do famoso "Homem Vitruvius" o sistema redox do holobionte humano e fora de sua aura as doenças mais frequentes causadas ou consequentes ao di-estresse oxidativo. É importante ressaltar que o di-estresse oxidativo não origina nenhum quadro clínico específico, mas esconde-se por detrás destas patologias a que está frequentemente associado. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

Espécie Química	Fórmula	Classe	Espécie Química	Fórmula	Classe
Oxigênio singlete	$^1\text{O}_2^*$	Não radical	Óxido nítrico	NO^*	Radical
Ânion superóxido	O_2^*	Radical	Ácido nitroso	HNO_2	Não radical
Ozônio	O_3	Não radical	Tetróxido nítrico	N_2O_4	Não radical
Radical hidroxila	HO^*	Radical	Trióxido nítrico	N_2O_3	Não radical
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Não radical	Peróxido nitrito	ONOO^-	Não radical
Radical alquil	R^*	Radical	Ácido peroxinitroso	ONOOH	Não radical
Radical (alquil) peroxil	ROO^*	Radical	Cátion nitrônio	NO_2^+	Não radical
(Alquil) hidroperóxido	ROOH	Não radical	(Alquil) peroxinitrito	ROONO^-	Não radical
Semiquinona (da coenzima Q_{10})	Q^*	Radical	Ácido hipocloroso	HClO	Não radical
Tocoferol (da vitamina E)	E-O^*	Radical	Radical till	$-\text{S}^*$	Radical

Figura 8. Espécies reativas oxidantes de maior interesse biológico: nome, fórmula química e classe de pertencimento (radical e não radical). Deve-se notar que o ânion superóxido é uma espécie redutora. Abaixo está uma representação esquemática das espécies reativas oxidantes mais comuns centradas no oxigênio. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

ROS	Fontes	Distância de migração	$T_{1/2}$	Modo de ação	Reação com proteínas	Reação com DNA	Sistema de eliminação
Oxigênio Singleto 	Membranas Mitocôndrias (cloroplastos)	30 nm	1–4 μ s	Oxidação de proteínas Ácidos graxos poliinsaturados e DNA	Ataca resíduos de tirosina, metionina e cisteína	*	Carotenóides e alfa-tocoferóis
Ânion Superóxido 	Membranas Mitocôndrias (cloroplastos)	30 nm	1–4 μ s	Ataca ligações duplas contendo compostos como a proteína (Fe-S)	Via centro-Fe	Extremamente baixa	Superóxido Dismutase (SOD)
Radical Hidroxila 	Membranas Mitocôndrias (cloroplastos)	1 nm	1 μ s	Extremamente reativa com todas biomoléculas	Reage rapidamente	Reage rapidamente	Flavonóides e prolina
Peróxido de hidrogênio 	Membranas Mitocôndrias (cloroplastos) Peroxissomas	1 μ	1 ms	Oxida proteínas e forma o radical hidroxila via ânion superóxido	Ataca resíduos de cisteína	Extremamente baixa	Glutathione peroxidase (GPx), catalase e flavonóides

* Reage preferencialmente com ácidos graxos poliinsaturados.

Figura 9. Espécies reativas centradas em oxigênio: fórmula química, fonte de produção, distância de migração, modo de ação, alvos biológicos e sistemas de neutralização. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

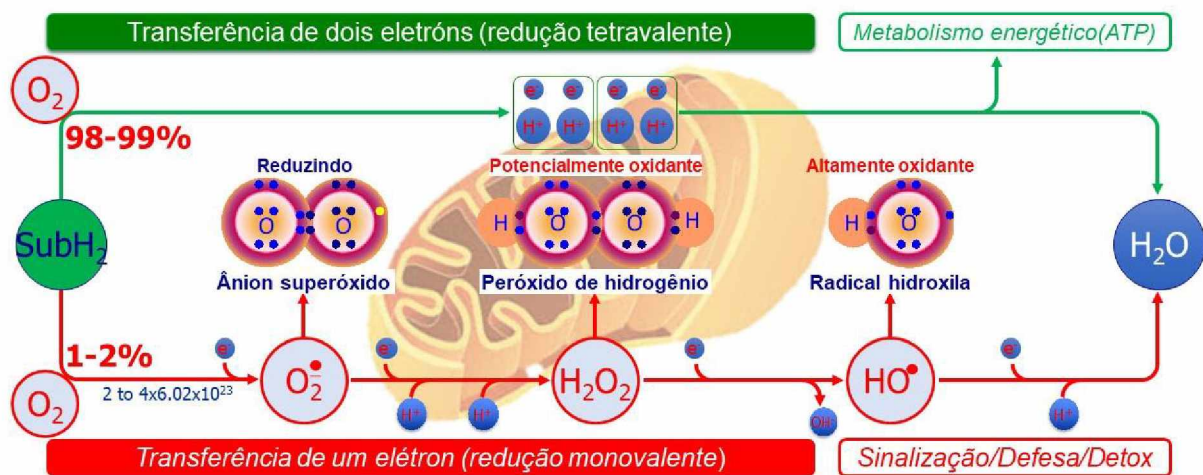


Figura 10. Meios de redução do oxigênio molecular ao nível da cadeia respiratória mitocondrial em condições fisiológicas. 98-99% do oxigênio inspirado é usado para aceitar pares de elétrons extraídos de substratos oxidáveis no curso do catabolismo celular; esse processo, chamado de redução tetravalente, é funcional à produção de energia química na forma de ATP (parte superior da imagem). Os 1-2% restantes do oxigênio inspirado aceitam os elétrons extraídos de substratos oxidáveis um de cada vez; esse processo, chamado de redução monovalente, leva à geração de espécies reativas de oxigênio, uma redutora (o ânion superóxido) e dois oxidantes (o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila) (parte inferior da imagem). [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

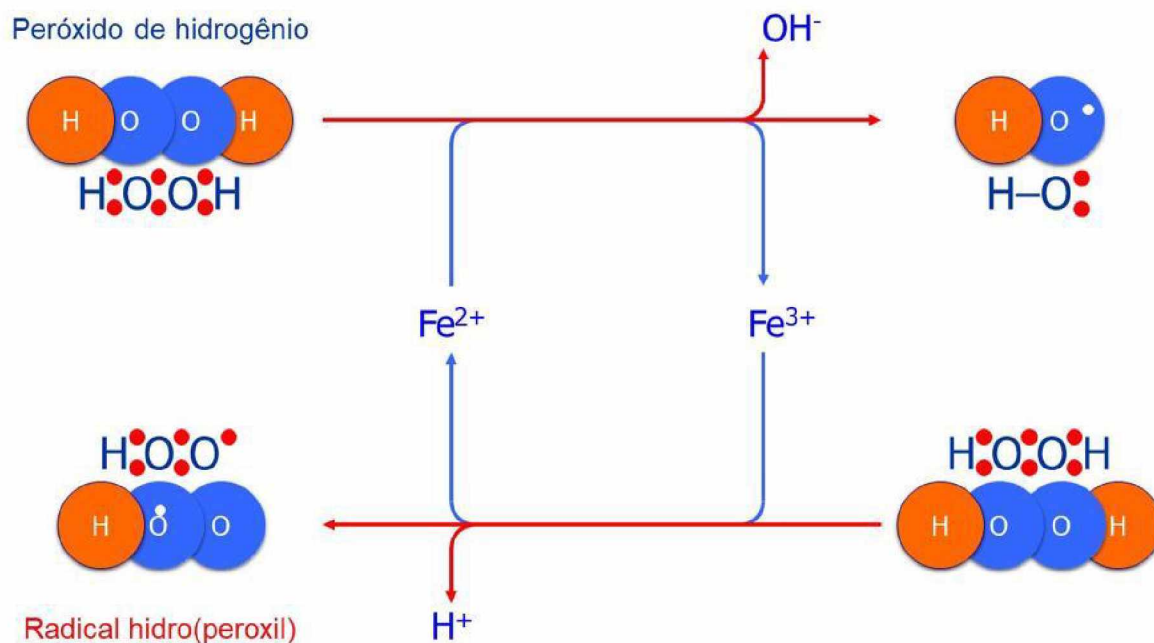


Figura 11. A reação de Fenton sobre o peróxido de hidrogênio. A passagem reversível de ferro entre íon ferroso e íon férrico é o mecanismo subjacente à geração, respectivamente, dos radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) e hidroperoxila ($\text{HOO}\cdot$). [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]



Figura 12. Classificação das espécies químicas redutoras/antioxidantes com base no critério da fonte de produção. À esquerda as espécies endógenas (enzimáticas e não enzimáticas), à direita as espécies exógenas, incluindo substâncias essenciais como as vitaminas C e E. Observe que o papel dessas espécies químicas é recuperar os alvos bioquímicos oxidados reversivelmente dos agentes oxidantes espécies reativas e, possivelmente, para neutralizar o efeito de espécies reativas oxidantes, se em excesso. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

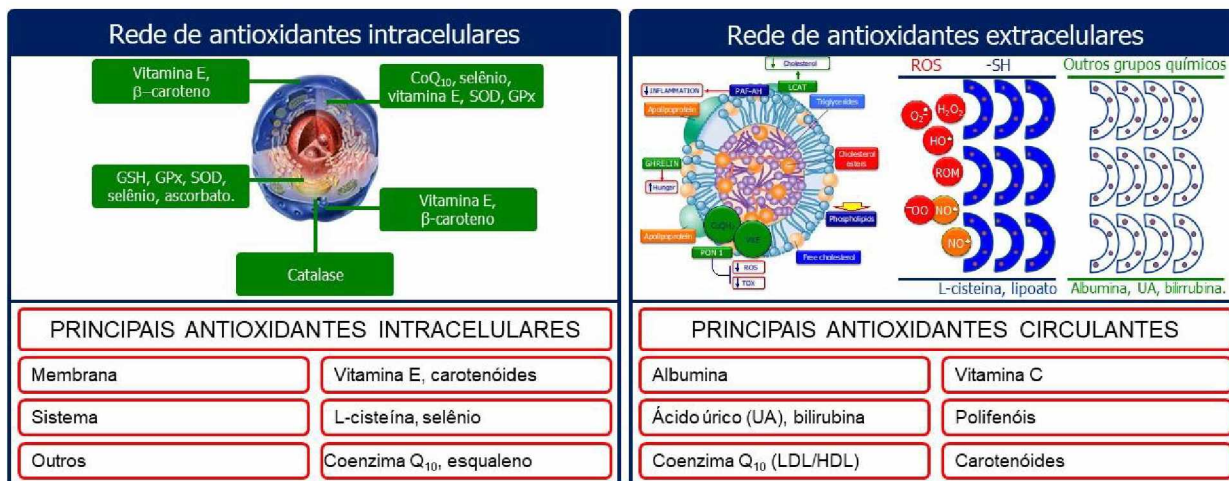


Figura 13. Representação esquemática da classificação das espécies redutoras/antioxidantes com base na sua distribuição no organismo humano. À esquerda os localizados dentro da célula e fora os detectáveis nos fluidos extracelulares (observe a associação de vitamina e ubiquinol com lipoproteínas circulantes). [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

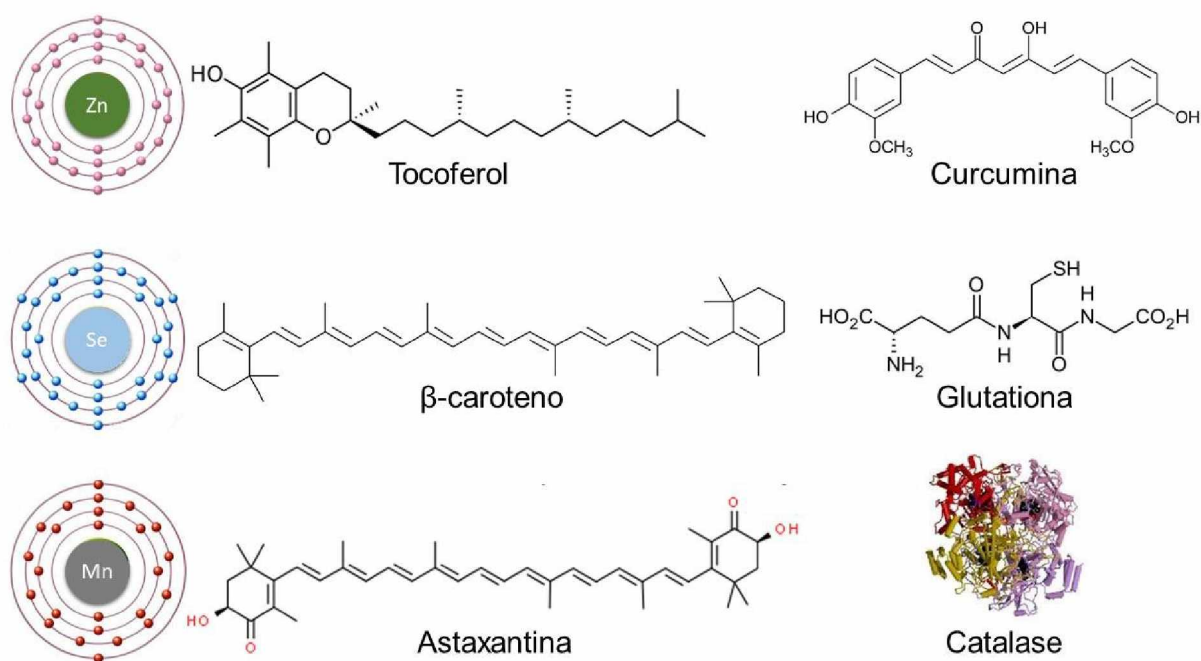


Figura 14. Heterogeneidade química das espécies químicas redutoras/antioxidantes. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

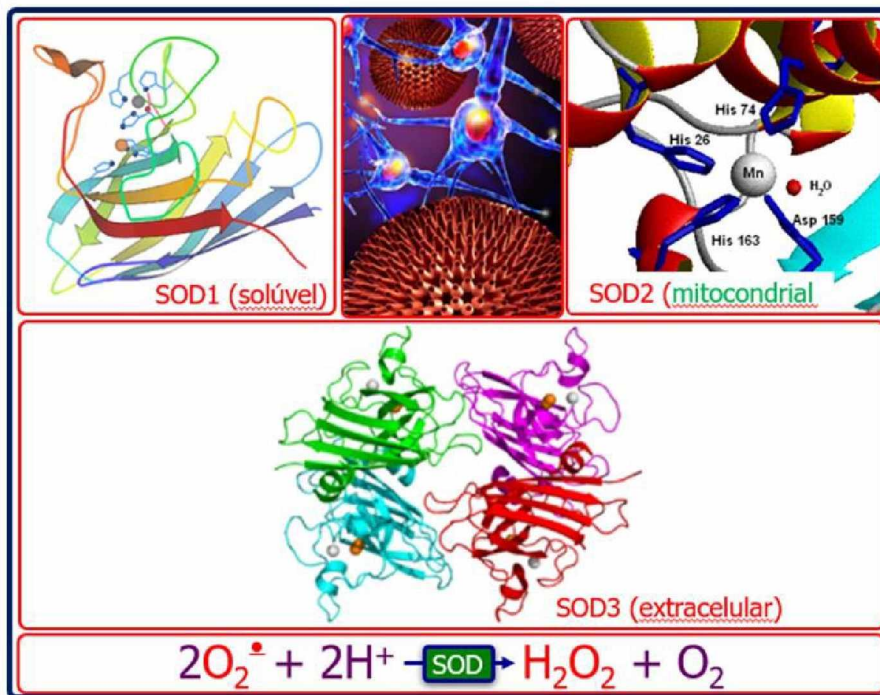


Figura 15. Características gerais da enzima superóxido dismutase. Formas, mecanismo de ação, estrutura, localização e papel biológico. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

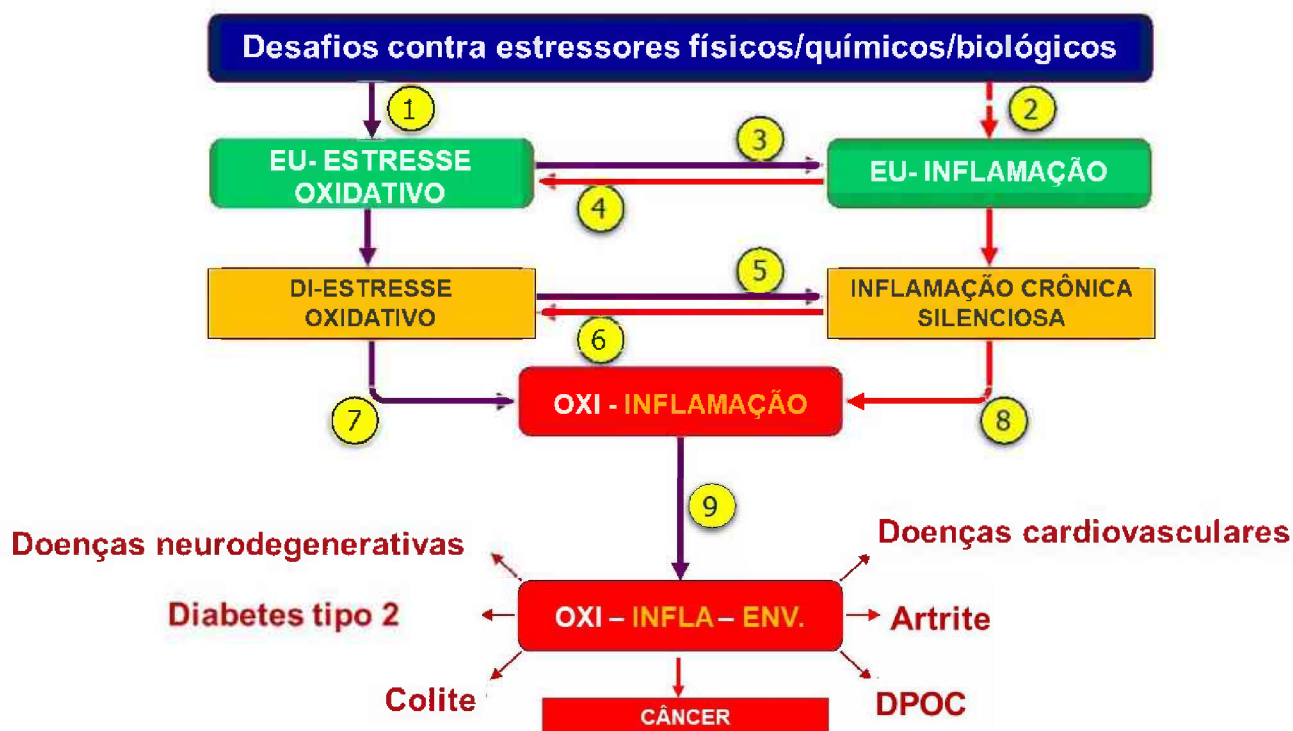


Figura 16. Relações entre estresse oxidativo e inflamação. Uma série de estressores pode causar tanto eu-stress oxidativo (1) quanto inflamação aguda (2), dois fenômenos reativos essenciais para a sobrevivência. Posteriormente, os dois fenômenos podem se somar (3, 4), e/ou cada um avançar para o próximo estágio, di-estresse oxidativo e inflamação crônica silenciosa, respectivamente, até interagirem entre si (5, 6) ou se somarem: oxi -inflamação (7, 8). Não identificada e oportunamente bloqueada, a oxi-inflamação torna-se responsável por um dos principais mecanismos de envelhecimento precoce e patologias associadas, inclusive no câncer (9). Ainda é debatido se o di-estresse oxidativo precede a inflamação: em qualquer caso, pode haver di-estresse oxidativo sem inflamação, mas nunca inflamação sem di-estresse oxidativo. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

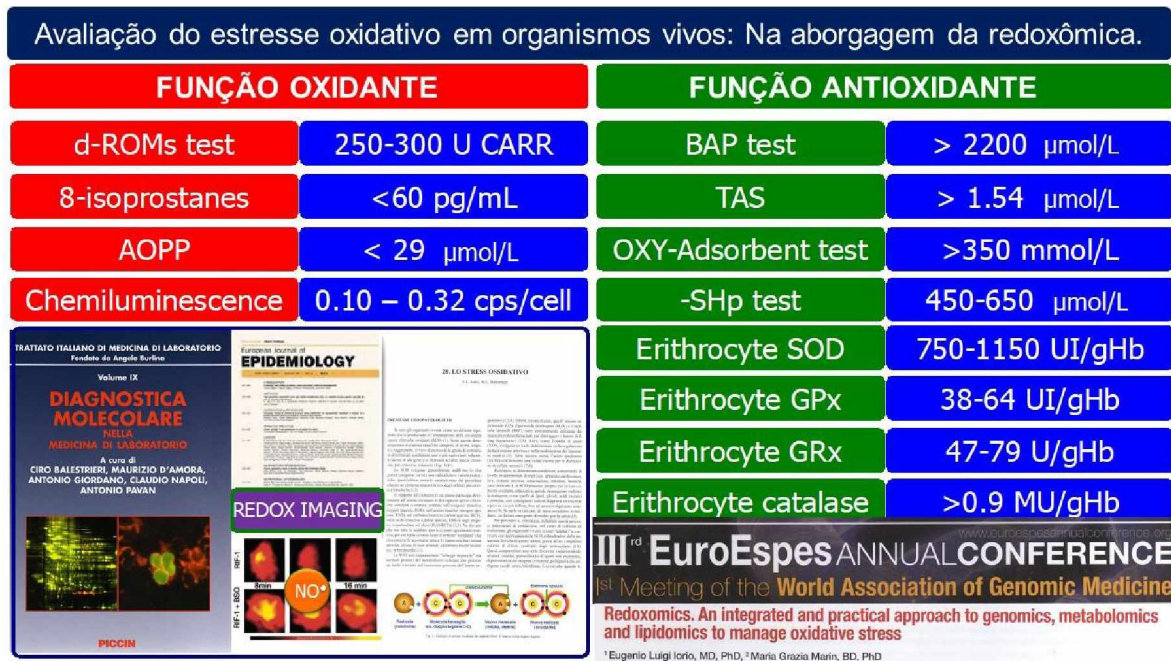


Figura 17. Representação esquemática dos testes mais comuns utilizados na prática clínica para medir o estresse oxidativo, geralmente a partir de uma amostra de sangue. À esquerda, os testes para avaliação do componente oxidante (em vermelho) e à direita os para avaliação do componente redutor/antioxidante (em verde). Para cada um deles, em um fundo azul, são indicados os valores de referência para a população humana. Nas duas caixas, no canto inferior esquerdo, em evidência, a capa do volume do Tratado Italiano de Medicina Laboratorial em que a avaliação do estresse oxidativo foi incluída pela primeira vez em 2008; à esquerda, o logotipo da III Conferência Anual Eurospes que sancionou oficialmente a conceituação da redoxômica com o artigo de Eugenio Luigi Iorio. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

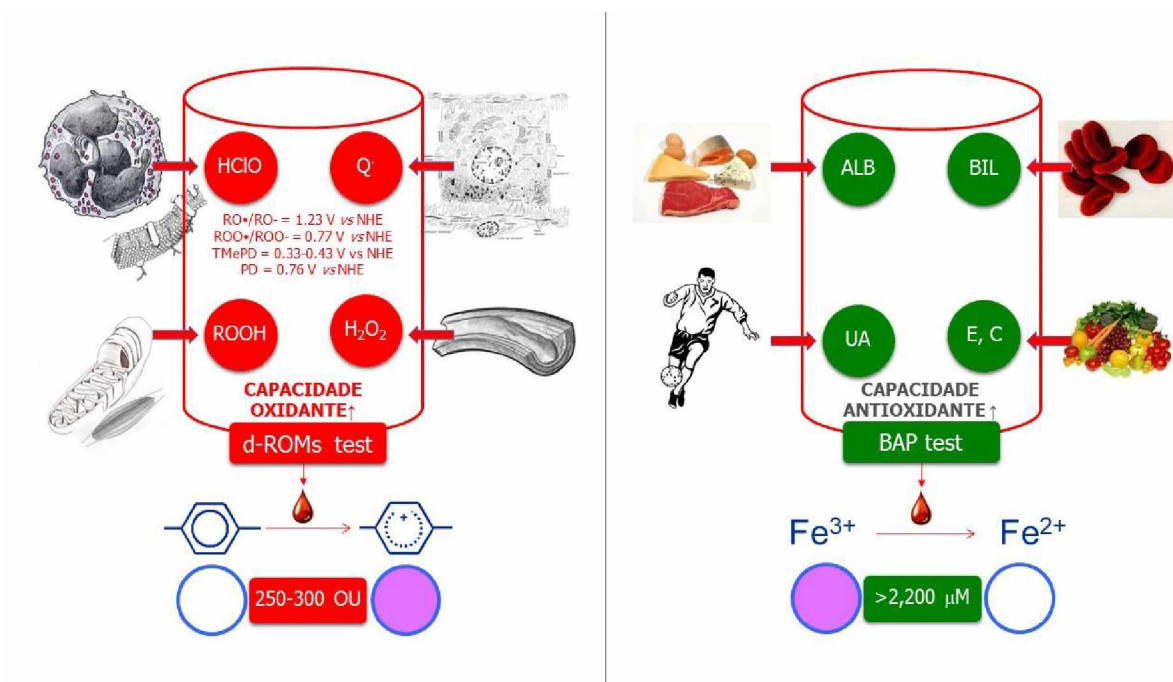


Figura 18. Avaliação global do estresse oxidativo. À esquerda, a representação esquemática do princípio em que se baseia o teste d-ROMs (medição da capacidade oxidante total do plasma), com os valores de referência na população humana adulta normal. À direita, a representação esquemática do princípio em que se baseia o teste BAP (medição da capacidade antioxidante total do plasma), com os valores de referência na população humana adulta normal. [Cortesia de Eugenio Luigi Iorio]

5- Referências

1. ABERTI, A., BOLOGNINI, L., CARRATELLI, M., DELLA BONA, M. A., & MACCIANTELLI, D. Assessing oxidative stress with the D-Roms test. Some mechanistic consideration. Anais. Proceedings of the SFRR Summer Meeting, 1997.
2. ALBERTI, A. et al. The radical cation of N,N-diethyl-para-phenylenediamine: A possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Research on Chemical Intermediates*, v. 26, n. 3, p. 253-267, 2000.
<https://doi.org/10.1163/156856700X00769>
3. ALI, S. S. et al. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of Food Biochemistry*, v. 44, n. 3, p. 1-13, 2020.
<https://doi.org/10.1111/jfbc.13145>
4. BARRERA, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*, v. 2012, p. 1-21, 2012.
<https://doi.org/10.5402/2012/137289>
5. BENZIE, I.; STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.*, v. 239, p. 70-76, 1996.
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
6. BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
<https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
7. BOAKYE, D. et al. Blood markers of oxidative stress are strongly associated with poorer prognosis in colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer*, v. 147, n. 9, p. 2373-2386, 2020.

<https://doi.org/10.1002/ijc.33018>

8. CALIRI, A. W.; TOMMASI, S.; BESARATINIA, A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 787, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108365>

9. DA COSTA SILVA, D.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Quimica Nova*, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000200024>

10. DI MASCIO, P. et al. Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. *Chemical Reviews*, v. 119, n. 3, p. 2043-2086, 2019.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00554>

11. DOHI, K. et al. Elevated plasma levels of bilirubin in patients with neurotrauma reflect its pathophysiological role in free radical scavenging. *In Vivo*, v. 19, n. 5, p. 855-860, 2005.

12. FIASCHI, T.; CHIARUGI, P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. *International Journal of Cell Biology*, v. 2012, 2012.

<https://doi.org/10.1155/2012/762825>

13. FILIOPOULOS, V. et al. Inflammation and oxidative stress in patients on hemodiafiltration. *American Journal of Nephrology*, v. 28, n. 6, p. 949-957, 2008.

<https://doi.org/10.1159/000142724>

14. FORMAN, H. J.; URSINI, F.; MAIORINO, M. An overview of mechanisms of redox signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 73, p. 2-9, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.01.018>

15. FUKUI, T. et al. Significance of measuring oxidative stress in lifestyle-related diseases from the viewpoint of correlation between d-ROMs and BAP in Japanese subjects. *Hypertension Research*, v. 34, n. 9, p. 1041-1045, 2011.

<https://doi.org/10.1038/hr.2011.76>

16. GÀO, X. et al. Pre-diagnostic derivatives of reactive oxygen metabolites and the occurrence of lung, colorectal, breast and prostate cancer: An individual participant data meta-analysis of two large population-based studies. *International Journal of Cancer*, v. 145, n. 1, p. 49-57, 2019.

<https://doi.org/10.1002/ijc.32073>

17. GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>

18. GENCER, M. et al. Association of serum reactive oxygen metabolite levels with different histopathological types of lung cancer. *Respiration*, v. 73, n. 4, p. 520-524, 2006.

<https://doi.org/10.1159/000088895>

19. GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. [s.l.: s.n.], v. 94

<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

20. GUPTA, R. K. et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 15, n. 11, p. 4405-4409, 2014.

<https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.11.4405>

21. HAJAM, Y. A. et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*, v. 11, n. 3, 2022.
<https://doi.org/10.3390/cells11030552>
22. HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
23. HANAHAN D., W. R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
24. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
25. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. 2 Biological hallmarks of cancer. p. 7-16, 2017.
26. HOMMA, T.; KOBAYASHI, S.; FUJII, J. Induction of ferroptosis by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 518, n. 3, p. 519-525, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.073>
27. IORIO, E. L. The d-ROMs test: validation , analytical performances and clinical applications . p. 1-18, 2005.
28. IORIO, E. L. The BAP test and the global assessment of oxidative stress in clinical practice. *The President of International Observatory of Oxidative*, v. 25, p. 4-19, 2010.

29. IORIO, E. L.; AMUSO, D. Skin, oxidative stress, and nutraceuticals. From the basic research to the clinical practice. *European Journal of Aesthetic Medicine & Dermatology*, n. 7, p. 6-22, 2017.
30. IORIO EL, M. M. Redoxomics. An integrated and practical approach to genomics, metabolomics and lipidomics to manage oxidative stress. *Gen-T*, v. 2, 2008.
31. ISLAM, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, v. 39, n. 1, p. 73-82, 2017.
<https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
32. ITO, K. et al. Serum antioxidant capacity and oxidative injury to pulmonary DNA in never-smokers with primary lung cancer. *Anticancer Research*, v. 32, n. 3, p. 1063-1067, 2012.
33. IVANOVA, A.; GERASIMOVA, E.; GAZIZULLINA, E. Study of Antioxidant Properties of Agents from the Perspective of Their Action Mechanisms. *Molecules*, v. 25, n. 18, 2020.
<https://doi.org/10.3390/molecules25184251>
34. JAKUBCZYK, K. et al. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020.
35. KIM, J. H. et al. Measurement of antioxidant capacity using the biological antioxidant potential test and its role as a predictive marker of metabolic syndrome. *Korean Journal of Internal Medicine*, v. 29, n. 1, p. 31-39, 2014.
<https://doi.org/10.3904/kjim.2014.29.1.31>
36. KIM, J.; KIM, J.; BAE, J. S. ROS homeostasis and metabolism: A critical

liaison for cancer therapy. *Experimental and Molecular Medicine*, v. 48, n. 11, 2016.

<https://doi.org/10.1038/emm.2016.119>

37. KITAOKA, T. et al. Evaluation of the efficacy of drug treatment based on measurement of the oxidative stress, using reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential, in children with autism spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2020.

<https://doi.org/10.1186/s40780-020-00164-w>

38. KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker Insights*, v. 13, 2018.

<https://doi.org/10.1177/1177271918755391>

39. LEMINEUR, T.; DEBY-DUPONT, G.; PREISER, J. C. Biomarkers of oxidative stress in critically ill patients: What should be measured, when and how? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 9, n. 6, p. 704-710, 2006.

<https://doi.org/10.1097/01.mco.0000247467.41661.f3>

40. LEYANE, T. S.; JERE, S. W.; HOURELD, N. N. Oxidative Stress in Ageing and Chronic Degenerative Pathologies: Molecular Mechanisms Involved in Counteracting Oxidative Stress and Chronic Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 13, 2022.

<https://doi.org/10.3390/ijms23137273>

41. LUBRANO, V. et al. A new method to evaluate oxidative stress in humans. *Immuno-Analyse et Biologie Specialisee*, v. 17, n. 3, p. 172-175, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(02\)01188-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(02)01188-2)

42. MARROCCO, I.; ALTIERI, F.; PELUSO, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine*

and Cellular Longevity, v. 2017, 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/6501046>

43. MATTSON, M. P. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Experimental Gerontology*, v. 44, n. 10, p. 625-633, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.07.003>

44. MERELLI, A. et al. Hypoxia, Oxidative Stress, and Inflammation: Three Faces of Neurodegenerative Diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 82, n. s1, p. S109-S126, 2021.
<https://doi.org/10.3233/JAD-201074>

45. MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 7, 2021.
<https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

46. MURATA, M. Inflammation and cancer. *Environmental Health and Preventive Medicine*, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2018.
<https://doi.org/10.1186/s12199-018-0740-1>

47. NIKI, E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 595, p. 19-24, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.017>

48. NISHIKAWA, M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Letters*, v. 266, n. 1, p. 53-59, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.031>

49. PALMIERI, B.; SBLENDORIO, V. Oxidative stress tests: overview on Part II. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 11, n. November, p. 383-399, 2007.
50. PERILLO, B. et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental and Molecular Medicine*, v. 52, n. 2, p. 192-203, 2020.
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>
51. PETROVIC, S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant supplementation in neurodegenerative diseases: A review of human studies. *Antioxidants*, v. 9, n. 11, p. 1-27, 2020.
<https://doi.org/10.3390/antiox9111128>
52. PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.
53. REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
54. RIMBACH, G. et al. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archives of Animal Nutrition*, v. 52, n. 3, p. 203-222, 1999.
<https://doi.org/10.1080/17450399909386163>
55. SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
56. SEN, C.; PACKER, L. of Gene Transcription Species. *Faseb*, v. 10, p. 709-720, 1996.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.10.7.8635688>

57. SHARIFI-RAD, M. et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, v. 11, n. July, p. 1-21, 2020.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
58. SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, v. 4, p. 180-183, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
59. SIES, H. Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00001-8>
60. SIES, H. Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. In: *Oxidative Stress*. [s.l.: s.n.] p. 3-12.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00001-8>
61. SINDHI, V. et al. Potential applications of antioxidants - A review. *Journal of Pharmacy Research*, v. 7, n. 9, p. 828-835, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>
62. TAFURI, S., COCCHIA, N., LANDOLFI, F., IORIO, E. L., & CIANI, F. Redoxomics and oxidative stress: From the basic research to the clinical practice. [s.l.: s.n.].
63. TAFURI, S. et al. Redoxomics and Oxidative Stress: From the Basic Research to the Clinical Practice. *Free Radicals and Diseases*, 2016.
<https://doi.org/10.5772/64577>
64. TAKAHASHI, K. et al. Cerebrospinal fluid levels of oxidative stress measured

using diacron-reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential in patients with Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Neuroscience Letters*, v. 757, n. February, p. 135975, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135975>

65. TAKAYANAGI, Y. et al. Association between systemic antioxidant capacity and retinal vessel diameters in patients with primary-open angle glaucoma. *Life*, v. 10, n. 12, p. 1-10, 2020.
<https://doi.org/10.3390/life10120364>

66. TROTTI, R.; CARRATELLI, M.; BARBIERI, M. Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Med*, v. 44, n. 1, p. 37-40, 2002.

67. VASSALLE, C. et al. Elevated hydroperoxide levels as a prognostic predictor of mortality in a cohort of patients with cardiovascular disease. *International Journal of Cardiology*, v. 110, n. 3, p. 415-416, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.08.046>

68. VELLOSA, J. C. R. et al. Oxidative stress: an introduction of state of art. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.
<https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-688>

69. YALE, S. H. et al. Erythrocyte Sedimentation Rate and C-reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine. *Wisconsin Medical Journal*, v. 115, n. 6, p. 317-321, 2016.

70. YIN, H. New techniques to detect oxidative stress markers: Mass spectrometry-based methods to detect isoprostanes as the gold standard for oxidative stress in vivo. *BioFactors*, v. 34, n. 2, p. 109-124, 2008.
<https://doi.org/10.1002/biof.5520340203>

Capítulo 2

CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO REDOX DE PACIENTES COM CÂNCER ATRAVÉS DOS TESTES D-ROMs E BAP E CORRELAÇÃO DESSES PARÂMETROS COM VARIÁVEIS SANGUÍNEAS

**Characterization of the redox status of cancer patients through
the d-ROMs and BAP test and correlation of these parameters
with blood variables**

Este capítulo foi redigido de acordo com os padrões da revista *Plos one* no qual será submetido para publicação

Characterization of the redox status of cancer patients through the d-ROMs and BAP test and correlation of these parameters with blood variables

Clarissa Aires de Oliveira^{1,2}, Eugenio Luigi Iorio², Lara Ferreira Paraiso¹, Foued Salmen Espíndola^{1*}

¹ Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil.

² International Observatory of Oxidative Stress. 84127, Salerno. Italy.

*Corresponding author:

Foued Salmen Espíndola

Address: Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia, Rua Acre s/n, Bloco 2E, 38400-319, Uberlândia, MG, Brazil.

Phone: 55+ (34) 999930670 E-mail: foued@ufu.br

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6937-1411>

Resumo

Di-estresse oxidativo e inflamação são distúrbios bioquímicos comuns em indivíduos com câncer. A mensuração do estresse oxidativo na oncologia é relevante na prática clínica para monitorar a eficácia das terapias e os efeitos indesejados do tratamento. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o estado redox por meio dos testes de metabólitos reativos de oxigênio (d-ROMs) e da capacidade antioxidante total (BAP); e investigar as correlações desses parâmetros com variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com câncer. Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo de análise de prontuários de pacientes avaliados no período de 2018 a 2020 em um centro de medicina integrativa. Os critérios de inclusão foram indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, diagnosticados com câncer e que realizaram o teste d-ROMs e BAP no mesmo período da análise de sangue. Seguindo os critérios de inclusão, a amostra final do estudo foi de 57 indivíduos, sendo 60% do sexo feminino e 40% do sexo masculino. O câncer de mama foi o mais frequente, seguido pelo de próstata, pulmão, intestino e melanoma de pele. A avaliação do estado redox mostrou que os níveis de d-ROMs estavam elevados ($420,2 \pm 112,1$ U CARR) na amostra total e maiores nas mulheres em relação aos homens ($p < 0,01$) já o teste BAP estava na faixa normal (2332 ± 812 $\mu\text{mol/L}$). Os parâmetros oxidativos, d-ROMs e OSI, correlacionaram-se positivamente com BAP, amplitude da distribuição eritrocitária (RDW – apenas d-ROMs), plaquetas (Plt), proteína C-reativa (CRP), velocidade de hemossedimentação (ESR) e negativamente com hemoglobina (Hb) e hemoglobina corpuscular média (MCH). Com relação ao índice de potencial antioxidante, BAP/dROMs, este correlacionou positivamente com Hb e albumina sérica (HAS) e negativamente com Plt, CRP e ESR. O estudo mostra que o estado redox de indivíduos com câncer está alterado, sendo possível monitorar esse sistema na prática clínica por meio dos testes d-ROMs e BAP. Esses parâmetros, além de serem adequados para avaliar o estresse oxidativo, foram correlacionados com parâmetros preditores de inflamação.

Palavras-chave: estresse oxidativo, teste BAP, teste d-ROMs, prognóstico, câncer

Abstract

Oxidative distress and inflammation are common biochemical disorders in individuals with cancer. The measurement of oxidative stress in oncology can be useful in clinical practice to monitor the effectiveness of therapy and unwanted effects of the treatment. Thus, the aim of the present study was to evaluate the redox status through the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) test and investigate the correlations of these parameters with hematological and biochemical variables in cancer patients. This is an observational, retrospective study of analysis of medical records of patients evaluated the period from 2018 to 2020 in an integrative medicine center. The inclusion criteria were individuals of both sexes, over 18 years of age, diagnosed with cancer who performed the d-ROMs and BAP test in the same period of blood analysis. Following the inclusion criteria, the final sample of the study were 57 individuals, 60% were woman and 40% were men. Breast cancers were most frequent, followed by prostate, lung, bowel, melanoma of skin. The evaluation of redox state showed that the d-ROMs were high (420.2 ± 112.1 U CARR) in total sample and higher in women compared to male ($p < 0.01$) and BAP tests were normal (2332 ± 812 $\mu\text{mol/L}$). The oxidative parameters, d-ROMs and OSI, was correlated positively with BAP, red cell distribution width (only d-ROMs), platelets (Plt), C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation (ESR) and negatively with hemoglobin (Hb) and mean corpuscular hemoglobin (MCH). Regarding the antioxidant potential index, BAP/dROMs, were correlated positively with Hb and serum albumin (HAS) and negatively correlated with Plt, CRP and ESR. The study shows that redox status of an individual with cancer is altered, and it is possible to monitor this system in clinical practice through d-ROMs and BAP test. These parameters, in addition to being suitable for assessing oxidative stress, were correlated with parameters predictors of inflammation.

Keywords: oxidative stress, BAP test, d-ROMs test, prognosis, cancer

Introduction

Oxidative stress is a variant of the biological phenomenon called “stress” and is the adaptative response enabled by any living organism to face a series of physical, chemical, and biological stressors and, therefore, to survive (1). In the last years new terms were introduced to classify subforms of oxidative stress and to conceptually introduce intensity scales ranging from physiological oxidative stress (eustress) to excessive and toxic oxidative burden (distress) (2–5).

The distress is a condition in which the redox system is unable to manage the exchange of reducing equivalents and the consequences are deleterious and can be of functional nature (e.g., a signaling or defense mechanisms impairment) and/or structural nature (e.g., a damage to proteins, lipids, nucleic acids, etc.) (2,3,6–9). On this basis, oxidative distress is involved in the pathogenesis and progression of several diseases including cancer (10–14).

Oxidative distress is not a disease, in the classical sense of the term, but rather an emerging health risk factor which, unfortunately, does not give rise to any specific clinical picture; it's symptoms or signs are in fact obscured by the underlying diseases with which it is associated (7,15–18) and can only be diagnosed through specific tests.

Several approaches are currently available to assess the redox function or state of an individual, ranging from *ex vivo* free radical determination through electron spin magnetic resonance to *in vivo* imaging methods. Unfortunately, most of these approaches are not yet applicable for clinical examination because of the instability of many reactive species and the need for expensive equipment (19). This made it difficult for many years to translate the enormous achievements of science in the field of redox phenomena into clinical practice.

However, over the last three decades different approaches have become available (20–23) with the aim to measure oxidative stress in the clinical practice. In this sense, there are some tests, based on the principle of photometry, that show great cost/benefit, highly sensitivity and specificity (24,25). The reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) test are based on this principle and are validated methods for measuring the pro-oxidant component and antioxidant capacity in plasma respectively (26–29).

By combining the results of d-ROMs and BAP test (alone or as oxidative stress indexes, i.e., OSI or BAP/d-ROMs ratios) it is possible to have suitable information about the redox status of the whole organism (26,28,30). In fact, both the d-ROMs and BAP tests have been shown to meet almost all the criteria of an ideal biomarker of oxidative stress for clinical practice (31–36) and have also proven useful in the evaluation of redox status in patients at risk for cancer or suffering from cancer, before and after antineoplastic treatment (37–41).

The possibility of globally measuring the redox function, through a careful evaluation of both the oxidant state and the reducing / antioxidant state, opens promising scenarios in the oncology field. In fact, the discovery of alteration oxidative stress biomarkers during a periodic health checkup, can be a valid clue to start more specific investigations aimed at highlighting neoplastic processes hitherto silent before they emerge clinically. For example, several epidemiological studies of oxidative stress markers in cancer, proved that high d-ROMs values are associated with prognosis of lung, colorectal, follicular lymphoma, and breast cancer (37,41–45).

Despite being reliable and widely used tests in several countries (24,36,46–49), d-ROMs and BAP tests have not yet been used in the Brazilian population. In addition, there is little evidence of the correlation of these parameters with blood variables that predict inflammation. Thus, the aim of the present study was to evaluate the redox status through the d-ROMs and the BAP test of Brazilian individuals with cancer and investigate the correlations of these parameters with hematological and biochemical variables.

Materials and methods

Population

The study was approved by the Human Research Ethics Committee (C.A.A.E 15193519.2.0000.5704/2019) of the Federal University of Uberlandia. This is an observational, retrospective study, analyzing the medical records of patients evaluated in the period 2018 to 2020 at the Conceito Saúde Clinic (CSC) located in Uberlandia - Minas Gerais, Brazil. The CSC is a center which specializes in integrative medicine where the patient's diagnostic and the therapeutic follow-up includes a detailed investigation of the individual's

biochemical, cellular and physiological processes, which includes the assessment of the redox status.

Thus, in the established period, more than 600 d-ROMs and BAP tests were performed at the center, and the inclusion criteria for selecting sample in the present study were: 1) individuals of both sexes, over 18 years of age and diagnosed with cancer (through laboratory diagnostic methods); 2) patients who performed hematological and biochemical tests in the same period as the d-ROMs and BAP test. Thus, following the inclusion criteria established the final sample of the study consisted of 57 individuals (Fig 1).

Blood collections and determination of hematological and biochemical variables

After fasting for 8–12 h blood samples were collected in evacuated tubes (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, Brazil) containing EDTA for hematological evaluation and without anticoagulant for biochemical determinations. The collection was carried out in the CSC and transported properly refrigerated (temperatures between 0 and 4°C) to the laboratory LABORMED, in Uberlandia, MG, Brazil where the analysis was performed.

Routine hematological variables, including erythrocytes (RBC), total leukocytes (Leu) and platelets (Plt) counts, hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were obtained in an automated hematology analyzer Sysmex XE 2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). The serum sample was used for the determination of biochemical parameters. Using the calorimetric method, the variable human serum albumin (HSA) was obtained. C-reactive protein (CRP) was obtained by turbidimetry method and direct bilirubin (DB) obtained by the colorimetric diazo method. All biochemical variables were determined with an automated biochemical analyzer Cobas 6000 (Roche, Germany).

Measurements of d-ROMs and BAP test

The reactive oxygen metabolites (d-ROMs) test is based on this principle which exploits the chromogenic properties of an aromatic amine, i.e., N, N-diethylparaphenylenediamine (DPPD). This compound, in its "basal" state, dissolved in water, gives rise to a colorless, transparent solution; however, when oxidizing species are added, it easily releases its electrons, causing the color of the solution to turn pink-red. Setting the wavelength of a photometer at 505 nm, it is possible to convert this oxidizing "power" into a number, through which the result of the d-ROMs test can be expressed (29,50).

For the measurement of d-ROMs, 10 μ L of fresh plasma and 20 μ L of chromogenic substrate (reagent R₁) were mixed with 1 mL of buffer pH 4.8 (reagent R₂). All the solutions were delicately mixed for 10 seconds and were read in spectrophotometer, by measuring their absorbance at 505 nm. Results were expressed in arbitrary units with normal values ranging from 250-300 U CARR, values above 300 indicate oxidative stress.

The BAP test exploits the chromogenic properties of the iron complex of isocyanate derivative. A water solution of such ferric ions (Fe^{3+}) complex is red; however, when antioxidant species are added, the Fe^{3+} ions capture the electrons they donate and, transforming into ferrous ions (Fe^{2+}), cause the breakdown of the colored complex, so that the solution becomes less red, tending to transparent. The more intense the observed color variation (from red-pink to colorless), the greater the "antioxidant power" of the biological sample examined and, consequently, the greater the capacity of the redox system to make available antioxidant species. A photometer will convert this antioxidant "power" into a number, through which the result of the BAP test will be expressed (26).

For the measurement of BAP, 10 μ L of plasma were dissolved in 1 mL of a solution previously prepared by dissolving 50 μ L of a thiocyanate derivative (R₁ reagent) in 950 μ L of a solution of ferric chloride (reagent R₂). The solution was mixed by inversion for 10 seconds and the reduction of ferric ion was quantitated by measuring the change in absorbance at 505 nm, indicating the antioxidant activity of the serum sample. Values ≥ 2200 $\mu\text{mol/L}$ were considered optimal; values below indicate oxidative stress due to low level of antioxidant activity/level (26).

The d-ROMs and BAP tests were performed using the FRAS 4 analyzer (Health & Diagnostics Limited Co., Parma, Italy) and the reagents for both tests were purchased from Wismerll Co., Ltd (Tokyo, Japan).

Calculation of the Oxidative stress index (OSI) and BAP/dROMs

The ratio of d-ROMs to BAP gives the OSI (51), this ratio has been proven to be clinically relevant for evaluating the severity of certain diseases and since the shift of oxidative/antioxidative balance toward the oxidative side is considered to represent oxidative stress (52,53).

In order to highlight the differences between antioxidant and pro-oxidant potential the ratio between BAP and d-ROMs was evaluated (BAP/dROMs) (54–56).

Statistical analysis

Data analysis was performed by using IBM SPSS statistics version 21.0 (SPSS, Chicago, IL). Data distribution was performed using the Shapiro Wilk test. Continuous variables were expressed as the mean \pm standard deviation or median and interquartile range. Differences between groups were calculated by unpaired t test (for normality variables) or Mann Whitney test (for nonparametric variables). Correlations between variables tested were assessed by Spearman's correlation coefficient. A value of $p \leq 0.05$ was taken to be statistically significant.

Results

The characterization of the sample is presented in table 1, with 34 (60%) were female and 23 (40%) male patients. Breast cancers were most frequent, followed by prostate, lung, bowel and melanoma of skin.

Figure 2 presents the results of the assessment of the redox status of patients. In total sample the mean of the d-ROMs were 420.2 ± 112.1 (U CARR), BAP test 2332 ± 812 ($\mu\text{mol/L}$), OSI ratio 0.16 ± 0.05 and BAP/dROMs ratio 6.02 ± 2.88 . Comparison of redox tests between the sexes revealed that d-ROMs values were higher in women ($p < 0.01$).

Table 2 presents the characterization of the evaluation variables of the hematological and biochemical profile that were used to test correlations with the redox state parameters showed in table 3.

The Spearman correlation of all blood variables with the parameters of evaluation of the redox status was performed. It was found that d-ROMs was correlated positively with BAP, RDW, Plt, CRP, ESR and negatively with Hb and MCH. Regarding the OSI was positively correlated with Plt, CRP and ESR; negatively correlated with Hb and HAS. Ultimately BAP/dROMs correlated positively with Hb and HAS and negatively correlated with Plt, CRP and ESR (Table 3).

Regarding blood parameters, RDW, Plt, CRP and ESR were positively correlated. In addition, Plt positively correlated with Leu and ESR negatively correlated with DB and HSA. The non-enzymatic blood antioxidants, DB and HAS, correlated negatively with only ESR, RDW (DB only), and CRP (HSA only) (Table 3).

Discussion

In the present study a simple and reliable method was used that performs a simultaneous evaluation of the redox state and, consequently, identifies the oxidative stress, through the measurement of d-ROMs, which measures the ROS production index, and the BAP test, which measures the antioxidant capacity. Numerous studies have demonstrated the usefulness and effectiveness of the evaluation of the redox state through these two tests, both in the evaluation in humans and in animals (11,14,36,42,43,47,57–59) however, this is the first time that there was a correlation investigation of both parameters with a wide range of hematological and biochemical variables.

The evaluation of the redox state in the present study identified that the d-ROMs values were above normal levels (420.2 ± 112.1 U CARR), while the BAP test value was within the levels considered adequate (2332 ± 812 $\mu\text{mol/L}$). In addition, blood markers of inflammation, CRP, RDW, and Plt correlated positively with d-ROMs, OSI and negatively with BAP/dROMs (except the RDW).

ROS metabolism in cancer cells is an area of research that is still in progress, but it is already well established that an excess of ROS is involved in the

process of carcinogenesis, both as risk factors and in the progression of the disease (10). Elevated serum levels of d-ROMs have already been identified in other studies involving individuals with various pathologies including cancer (34,42,43,46,49,60,61). Like in the meta-analysis performed by GÀO et al. (2019), who identified high levels of d-ROMs in cancer patients and a direct association of this parameter with the risk of developing lung, breast, and colorectal cancer (11). Another study that found high levels of d-ROMs in cancer patients was developed by MONTOVANI et al.; (2002) in this work, the authors used d-ROMs levels to monitor the impact of an antioxidant therapy on the management of oxidative stress (62).

Increased reactive oxygen species in cancer patients, as observed in the present study, can be caused by various tumor progression mechanisms, such as hypoxia, tumor cell survival, proliferation, chemo- and radio-resistance, invasion, angiogenesis and metastasis (63,64) and may act, and contribute to a series of pathophysiological events directly related to disease progression. Established events include involvement in cell cycle progression and proliferation, apoptosis, cell adhesion, motility, and tumor maintenance (4,10,18).

The analysis of comparison between the genders revealed the d-ROMs was significantly higher in women. This result agrees with other studies carried out in healthy individuals (47) and individuals with various pathologies (35,43,46,49,58,65). One of the possible explanations for this result is the hormonal changes in women associated with blood concentrations of estrogen and, therefore, on menopausal status (46).

The present study sought to investigate associations between oxidative stress markers and blood parameters. In this sense, important correlations were found, such as the positive correlation between the d-ROMs and BAP parameters, proving the close relationship between the pro-oxidant/ antioxidant system.

Another important result was the positive correlations found between d-ROMs, OSI, RDW, Plt, CRP and ESR, confirming an interrelationship between oxidative stress and inflammation parameters. This relationship is complex, but several studies prove the close association between this process (5,15,59,66). In the present study, a direct association was found between the oxidative

parameters d-ROMs and OSI with the inflammatory markers RDW (d-ROMs only) (68), platelets (69,70), ESR and CRP (71).

Since it has been demonstrated that a strong, positive, and independent association exists between RDW and conventional inflammatory biomarkers (72) several studies have been developed and have confirmed RDW as an interesting variable for inflammatory predictor in various disorders including functional bowel conditions, autoimmune diseases, malignancy, COVID-19 and multiple hospital admissions in subjects with chronic conditions (68). In agreement with the present study, Karakilcik et al., (2014) and Semba et al., (2010) demonstrated a positive correlation between RDW and biomarkers of oxidative stress. The reason for this relationship is the fact that oxidative stress exerts a profound effect on red blood cell homeostasis, such as a change in size, increasing its heterogeneity and therefore RDW (73,74). Therefore, oxidative stress increased red cell turnover, thus contributing to the association between anisocytosis and human pathology (68).

Another important finding of the study was the correlation between d-ROMs and platelets. This result indicates the complex relationship between oxidative stress, thrombotic processes and inflammation. Other studies have found similar evidence, such as the study developed by FRANCO et al (2015), who present an association between platelets, inflammation, and cancer (70). According to these authors, essential characteristics of cancer disease, previous described by Hanahan and Weiberg (2000) (75), such as cellular and microenvironment alterations necessary for malignant transformation, dysregulation of cell energetics, avoidance of immune destruction, genomic instability, and tumor-promoting inflammation resemble the inflamed state, placing the platelet within an interface that links thrombosis, inflammation, and cancer (70).

The ESR correlated positively with oxidative and inflammations markers, d-ROMs, OSI, Plt and CRP and negatively with antioxidants biomarkers, BAP/dROMs, DB and HAS. ESR is a non-specific index of inflammation which measures the rate at which red blood cells sediment in a period of one hour (71,76). The ESR and CRP are the most commonly used laboratory tests for detecting the acute phase response and thus diagnosis and monitoring of inflammatory condition. However, few studies have investigated the association of

this parameter with oxidative stress. Some studies carried out with patients with rheumatoid arthritis (77) and depression (76) and showed that ESR to be affected by numerous physiologic and pathophysiologic conditions that involve not only changes of fibrinogen concentration in plasma but also alterations in the size, shape, and/or number of RBCs as well as presence of non-acute phase reaction proteins.

Other authors carried out investigations between the oxidative parameter d-ROMs with inflammatory variables CRP, such as FAIENZA et al. (2012) who found negative correlations between the BAP/d-ROMs index with CRP and cholesterol in obese children [73]. FUKUI et al. (2011), found positive correlations between d-ROMs with CRP and creatinine in Japanese subjects. HIROSE et al., (2009), that found positive correlations between d-ROMs with CRP in diabetics individuals.

A large study developed by Aleksandrova et al., 2014 demonstrated through multivariable-adjusted logistic regression a positive association between d-ROMs/CRP with the risk of developing colorectal cancer (12). Excessive and uncontrollable production of reactive oxygen species results in persistent injury of cells in the tissue and consequently chronic inflammation (78). In turn, inflammatory cells produce soluble mediators, which act by further recruiting inflammatory cells to the site of injury and producing more reactive species. This sustained inflammatory/oxidative environment leads to an enhanced production of hydroperoxides in a vicious circle, which can damage healthy cells and over a long time may lead to carcinogenesis (66). In the case of patients already diagnosed with cancer, the high production of reactive oxygen species in preclinical tumors contributes to this cycle of oxy-inflammation.

The BAP/d-ROMs index correlated positively with the endogenous antioxidant's albumin and bilirubin (borderline correlation) and negatively with platelet, CRP and ESR. The direct correlation between the index and the endogenous antioxidants, demonstrates this parameter is also useful to evaluate the relative antioxidant capacity. Furthermore, the inverse correlation with inflammatory variables corroborates the hypothesis of the close relationship between distress and inflammation.

The study had some limitations such as the sample size, being a retrospective study in which it was not possible to consider lifestyle factors or

tumor severity or treatments. Despite this, important results with scientific basis were found, concluding that through the analysis of the d-ROMs and BAP tests, the redox state of cancer patients is in a situation of potential oxidative stress, in which despite the reactive species being produced in excess, the antioxidant system is working to achieve redox balance. Furthermore, hematological and inflammatory markers are parameters that directly affect the redox state and can influence to the development of oxidative distress.

The results found suggest that the d-ROMs and the BAP tests are simple and reliable for the diagnosis of oxidative stress and were associated with markers of inflammation. The measurement of these parameters provides information about oxidation and inflammation condition and can have important implications both in monitoring the health status of patients, the efficacy and safety of the treatments.

Author Contributions: Conceptualization, Clarissa Aires de Oliveira, Eugenio Luigi Iorio; Methodology Eugenio Luigi Iorio and Clarissa Aires de Oliveira; Data curation Lara Ferreira Paraiso — original draft preparation, Clarissa Aires de Oliveira, Eugenio Luigi Iorio, Lara Ferreira Paraiso and Foued Salmen Espindola; writing—review and editing, Foued Salmen Espindola and Eugenio Luigi Iorio; visualization, Foued Salmen Espindola; supervision, Foued Salmen Espindola; project administration, Foued Salmen Espindola and Clarissa Aires de Oliveira; funding acquisition, Foued Salmen Espindola and Clarissa Aires de Oliveira. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: FSE is supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG [Minas Gerais Network for Translational Research in Immunobiologicals and Biopharmaceuticals in Cancer] (REMITRIBIC, RED-00031-21)]. FSE receive scholarship grants from FAPEMIG (PPM-00503-18) and CNPq (PQ – Research productivity, process no. 312812/2021-3).

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Fink G. Stress Science: neuroendocrinology. In: Stress: definition and history. 3^o ed 2010. p. 319-28.
2. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. Redox Biol [Internet]. 2017;11(December 2016):613-9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
3. Niki E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? Arch Biochem Biophys. 2016;595:19-24.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.017>
4. Liou G-Y SP. Reactive oxygen species in cancer. Free Radic Res. 2010;44(5):1-31.
<https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
5. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. Apmis. 2007;115(2):81-103.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_514.x
6. Niki E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. Free Radic Biol Med [Internet]. 2009;47(5):469-84. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>
7. Sies H. Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. In: Oxidative Stress. 2020. p. 3-12.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00001-8>
8. Sies H. Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks

[Internet]. Oxidative Stress: Eustress and Distress. Elsevier Inc.; 2019. 3-12 p. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00001-8>
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00001-8>

9. Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* [Internet]. 2015;4:180-3. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

10. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020;38(2):167-97.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>

11. Gào X, Wilsgaard T, Jansen EHJM, Holleczeck B, Zhang Y, Xuan Y, et al. Pre-diagnostic derivatives of reactive oxygen metabolites and the occurrence of lung, colorectal, breast and prostate cancer: An individual participant data meta-analysis of two large population-based studies. *Int J Cancer*. 2019;145(1):49-57.
<https://doi.org/10.1002/ijc.32073>

12. Aleksandrova K, Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Fedirko V, Kaaks R, Lukanova A, et al. Biomarker patterns of inflammatory and metabolic pathways are associated with risk of colorectal cancer: Results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Eur J Epidemiol*. 2014;29(4):261-75.
<https://doi.org/10.1007/s10654-014-9901-8>

13. Leufkens AM, Van Duijnhoven FJB, Woudt SHS, Siersema PD, Jenab M, Jansen EHJM, et al. Biomarkers of oxidative stress and risk of developing colorectal cancer: A cohort-nested case-control study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Epidemiol*. 2012;175(7):653-63.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwr418>

14. Gencer M, Ceylan E, Aksoy N, Uzun K. Association of serum reactive oxygen metabolite levels with different histopathological types of lung cancer. *Respiration*. 2006;73(4):520-4.

<https://doi.org/10.1159/000088895>

15. Bouhamida E, Morciano G, Perrone M, Kahsay AE, Sala M Della, Wieckowski MR, et al. The Interplay of Hypoxia Signaling on Mitochondrial Dysfunction and Inflammation in Cardiovascular Diseases and Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Approaches. *Biology (Basel)*. 2022;11(2):1-32.

<https://doi.org/10.3390/biology11020300>

16. Kong H, Chandel NS. Reactive oxygen species and cancer [Internet]. *Oxidative Stress: Eustress and Distress*. Elsevier Inc.; 2019. 619-637 p. Available at:

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00030-4>

17. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014;15(6):411-21. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3801>

18. Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol*. 2012;2012:1-21.

<https://doi.org/10.5402/2012/137289>

19. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 2006;52(4):601-23.

<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>

20. Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress tests : overview on Part II. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2007;11(November):383-99.

21. Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, et al. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Anim Nutr.* 1999;52(3):203-22.

<https://doi.org/10.1080/17450399909386163>

22. Yin H. New techniques to detect oxidative stress markers: Mass spectrometry-based methods to detect isoprostanes as the gold standard for oxidative stress in vivo. *BioFactors.* 2008;34(2):109-24.

<https://doi.org/10.1002/biof.5520340203>

23. Ito F, Ito T, Suzuki C, Yahata T, Ikeda K, Hamaoka K. The application of a modified d-ROMs test for measurement of oxidative stress and oxidized high-density lipoprotein. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2).

<https://doi.org/10.3390/ijms18020454>

24. Hayashi I, Morishita Y, Imai K, Nakamura M, Nakachi K, Hayashi T. High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2007;631(1):55-61.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.006>

25. Yale SH, Bray C, Bell LN, Liang H, Haykal R, Kaiksow F, et al. Erythrocyte Sedimentation Rate and C-reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine. *Wis Med J.* 2016;115(6):317-21.

26. Iorio EL. The BAP test and the global assessment of oxidative stress in 24 clinical practice. *Pres Int Obs Oxidative.* 2010;25:4-19.

27. IORIO EL. No Title. In: . Fundamental principles, significance and clinical application of oxidative stress assessment (d-ROMs, BAP and other Carratelli's panel test). Korea; 2011.

28. Iorio EL. The d-ROMs test: validation, analytical performances and clinical applications.

29. Aberti, A., Bolognini, L., Carratelli, M., Della Bona, M. A., & Mavviantelli D. No Title. In: Assessing oxidative stress with the D-Roms test Some mechanistic consideration. Proceedings of the SFRR Summer Meeting; 1997. p. 82-3.

30. Colombini F, Carratelli M, Alberti A. Oxidative stress, d-ROMs test, and ceruloplasmin. Free Radic Res. 2016;50(4):447-53.
<https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1136063>

31. Iorio, E. L., & SpA CGB. La sindrome da di-stress ossidativo. Mito o realtà? 2009.

32. Takahashi K, Iwaoka K, Takahashi K, Suzuki Y, Taguchi K, Yamahara K, et al. Cerebrospinal fluid levels of oxidative stress measured using diacron-reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential in patients with Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. Neurosci Lett [Internet]. 2021;757(February):135975. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135975>
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135975>

33. Takayanagi Y, Takai Y, Kaidzu S, Tanito M. Association between systemic antioxidant capacity and retinal vessel diameters in patients with primary-open angle glaucoma. Life. 2020;10(12):1-10.
<https://doi.org/10.3390/life10120364>

34. Shibata A, Izumiya Y, Yamaguchi Y, Kitada R, Iwata S, Ehara S, et al. Increased oxidative stress during exercise predicts poor prognosis in patients with acute decompensated heart failure. ESC Hear Fail. 2021;8(5):3885-93.
<https://doi.org/10.1002/ehf2.13538>

35. Kitaoka T, Morimoto M, Hashimoto T, Tsuda Y, Nakatsu T, Kyotani S. Evaluation of the efficacy of drug treatment based on measurement of the oxidative stress, using reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential, in children with autism spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *J Pharm Heal Care Sci.* 2020;6(1):1-8. <https://doi.org/10.1186/s40780-020-00164-w>

36. Ishikawa K, Inoue Y, Sumi Y, Kondo Y, Okamoto K, Tanaka H. Novel biomarkers of oxidative stress as predictive indicators of neurological outcome after out-of-hospital cardiopulmonary arrest. *Am J Emerg Med* [Internet]. 2021;45(xxxx):264-8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.08.059>

37. Arakaki H, Osada Y, Takanashi S, Ito C, Aisa Y, Nakazato T. Oxidative Stress Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Follicular Lymphoma. *Blood* [Internet]. 2016;128(22):1787-1787. Available at: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V128.22.1787.1787>
<https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.1787.1787>

38. Araki O, Matsumura Y, Inoue T, Karube Y, Maeda S, Kobayashi S, et al. Association of perioperative redox balance on long-term outcome in patients undergoing lung resection. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;24(1):13-8. <https://doi.org/10.5761/atcs.oa.17-00127>

39. Corsi MM, Pagani D, Iorio EL, Dogliotti G, Verna R, Sambataro G, et al. Blood reactive oxygen metabolites (ROMs) and total antioxidant status (TAS) in patients with laryngeal squamous cell carcinoma after surgical treatment. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(8):1047-8. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.181>

40. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Gramignano G, Lusso MR, et al. The impact of different antioxidant agents alone or in combination on reactive

oxygen species, antioxidant enzymes and cytokines in a series of advanced cancer patients at different sites: Correlation with disease progression. *Free Radic Res.* 2003;37(2):213-23.

<https://doi.org/10.1080/10715760303849>

41. Sukkar SG, Cella F, Rovera GM, Nichelatti M, Ragni G, Chiavenna G, et al. A multicentric prospective open trial on the quality of life and oxidative stress in patients affected by advanced head and neck cancer treated with a new benzoquinone-rich product derived from fermented wheat germ (Avemar). *Med J Nutrition Metab.* 2008;1(1):37-42.

<https://doi.org/10.3233/s12349-008-0008-4>

42. Boakye D, Jansen L, Schöttker B, Jansen EHJM, Schneider M, Halama N, et al. Blood markers of oxidative stress are strongly associated with poorer prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2020;147(9):2373-86.

<https://doi.org/10.1002/ijc.33018>

43. D'Arena G, Vitale C, Perbellini O, Coscia M, La Rocca F, Ruggieri V, et al. Prognostic relevance of oxidative stress measurement in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 2017;99(4):306-14.

<https://doi.org/10.1111/ejh.12918>

44. Mandal P. Potential biomarkers associated with oxidative stress for risk assessment of colorectal cancer. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017;390(6):557-65.

<https://doi.org/10.1007/s00210-017-1352-9>

45. Sugimoto K, Sakamoto K, Kawai M, Kawano S, Munakata S, Ishiyama S, et al. Serum oxidative stress is an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Transl Cancer Res.* 2019;8(5):1699-708.

<https://doi.org/10.21037/tcr.2019.08.15>

46. Anusruti A, Xuan Y, Gào XN, Jansen EHJM, Laetsch DC, Brenner H, et al. Factors associated with high oxidative stress in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis of two cohort studies. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020;8(1). <https://doi.org/10.1136/bmidrc-2019-000933>
47. Fukui T, Yamauchi K, Maruyama M, Yasuda T, Kohno M, Abe Y. Significance of measuring oxidative stress in lifestyle-related diseases from the viewpoint of correlation between d-ROMs and BAP in Japanese subjects. *Hypertens Res*. 2011;34(9):1041-5. <https://doi.org/10.1038/hr.2011.76>
48. Lubrano V, Vassalle C, L'Abbate A, Zucchelli GC. A new method to evaluate oxidative stress in humans. *Immuno-Analyse Biol Spec*. 2002;17(3):172-5. [https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(02\)01188-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(02)01188-2)
49. Xuan Y, Bobak M, Anusruti A, Jansen EHJM, Pająk A, Tamosiunas A, et al. Association of serum markers of oxidative stress with myocardial infarction and stroke: pooled results from four large European cohort studies. *Eur J Epidemiol*. 2019;34(5):471-81. <https://doi.org/10.1007/s10654-018-0457-x>
50. Liang Y, James R, Roedeb SD, Nana Gletsu Millerd SC, Jre D, Arshed Quyyumif DPJ. Determination of ebselen-sensitive reactive oxygen metabolites (ebROM) in human serum based upon N,N'-diethyl-1,4- phenylenediamine oxidation. *Clin Chim Acta*. 2012;414:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.06.003>
51. Hussein MH, Hashimoto T, Daoud GAH, Kakita H, Kato S, Goto T, et al. Oxidative stress after living related liver transplantation subsides with time in pediatric patients. *Pediatr Surg Int*. 2011;27(1):17-22. <https://doi.org/10.1007/s00383-010-2721-3>

52. Kakita H, Hussein MH, Yamada Y, Henmi H, Kato S, Kobayashi S, et al. High postnatal oxidative stress in neonatal cystic periventricular leukomalacia. *Brain Dev.* 2009;31(9):641-8.
<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2008.10.008>

53. Kaneko K, Takahashi M, Yoshimura K, Kitao T, Yamanouchi S, Kimata T, et al. Intravenous immunoglobulin counteracts oxidative stress in kawasaki disease. *Pediatr Cardiol.* 2012;33(7):1086-8.
<https://doi.org/10.1007/s00246-012-0229-4>

54. Faienza MF, Francavilla R, Goffredo R, Ventura A, Marzano F, Panzarino G, et al. Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Horm Res Paediatr.* 2012;78(3):158-64.
<https://doi.org/10.1159/000342642>

55. Pesce M, Tatangelo R, La Fratta I, Rizzuto A, Campagna G, Turli C, et al. Aging-Related Oxidative Stress: Positive Effect of Memory Training. *Neuroscience.* 2018;370(October):246-55.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.09.046>

56. Hatanaka H, Hanyu H, Fukasawa R, Hirao K, Shimizu S, Kanetaka H, et al. Differences in peripheral oxidative stress markers in Alzheimer's disease, vascular dementia and mixed dementia patients. *Geriatr Gerontol Int.* 2015;15:53-8.
<https://doi.org/10.1111/ggi.12659>

57. Celi P, Sullivan M, Evans D. The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood. *Vet J* [Internet]. 2010;183(2):217-8. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.09.018>
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.09.018>

58. Matsuura T, Kaneko H, Takayama K, Shibata R, Kataoka K, Ito S, et al.

Diacron reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential tests for patients with age-related macular degeneration. *BMC Ophthalmol.* 2020;20(1):1-7.
<https://doi.org/10.1186/s12886-020-01334-y>

59. Schöttker B, Saum KU, Jansen EHJM, Boffetta P, Trichopoulou A, Holleczeck B, et al. Oxidative stress markers and all-cause mortality at older age: A population-based cohort study. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci.* 2015;70(4):518-24.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glu111>

60. Ito K, Yano T, Morodomi Y, Yoshida T, Kohno M, Haro A, et al. Serum antioxidant capacity and oxidative injury to pulmonary DNA in never-smokers with primary lung cancer. *Anticancer Res.* 2012;32(3):1063-7.

61. Daiber A, Hahad O, Andreadou I, Steven S, Daub S, Münzel T. Redox-related biomarkers in human cardiovascular disease - classical footprints and beyond. *Redox Biol* [Internet]. 2021;42:101875. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101875>
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101875>

62. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Massa E, Gramignano G, et al. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms and serum cytokine levels in cancer patients: Impact of an antioxidant treatment. *J Cell Mol Med.* 2002;6(4):570-82.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00455.x>

63. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. *Int J Cell Biol.* 2012;2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/762825>

64. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.

<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

65. Kotani K, Tsuzaki K, Taniguchi N, Sakane N. Correlation between reactive oxygen metabolites & atherosclerotic risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian J Med Res.* 2013;137(4):742-8.

66. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603-16.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

67. Mizuguchi S, Izumi N, Tsukioka T, Komatsu H, Nishiyama N. Neutrophil-lymphocyte ratio predicts recurrence in patients with resected stage 1 non-small cell lung cancer. *J Cardiothorac Surg.* 2018;13(1):1-7.

<https://doi.org/10.1186/s13019-018-0763-0>

68. Arkew M, Gemechu K, Haile K, Asmerom H. Red Blood Cell Distribution Width as Novel Biomarker in Cardiovascular Diseases: A Literature Review. *J Blood Med.* 2022;Volume 13(July):413-24.

<https://doi.org/10.2147/JBM.S367660>

69. Thomas MR, Storey RF. The role platelets in inflammation. Theme Issue Article 449 Mark R. Thomas; Robert F. Storey. *Thromb Haemost.* 2015;1114(2):449-58.

<https://doi.org/10.1160/TH14-12-1067>

70. Franco AT, Corken A, Ware J. Review Article Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. 2016;126(5):582-9.

<https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-531582>

71. Lapić I, Padoan A, Bozzato D, Plebani M. Erythrocyte Sedimentation Rate and

C-Reactive Protein in Acute Inflammation. *Am J Clin Pathol*. 2019;1-14.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz142>

72. Lippi G, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL, Zoppini G, Guidi GC. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(4):628-32.
<https://doi.org/10.5858/133.4.628>

73. Semba RD, Patel K V, Ferrucci L, Sun K, Cindy NR, Guralnik, Jack M, et al. Serum antioxidants and inflammation predict red cell distribution width in older women: the Women's Health and Aging Study I. *Clin Nutr*. 2010;29(5):600-4.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.03.001>

74. Karakilcik A, Halat R, Zerim M, Celik H, Nazligul Y. Effects of vitamin C and exercise on lipid profile, platelet and erythrocyte indices in young soccer players. *J Sports Med Phys Fitness*. 2014;54(5):665-71.

75. Hanahan D. WRA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

76. Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: The potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2014;48:102-11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.09.017>
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.09.017>

77. Kardeş S, Karagülle M, Durak İ, Avcı A, Karagülle MZ. Association of oxidative stress with clinical characteristics in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(1).
<https://doi.org/10.1111/eci.12858>

78. Perše M. Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: Cause or consequence? Biomed Res Int. 2013;2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/725710>

Table 1. Baseline characteristics of the study population.

Number	Total	57
	Male	23
	Female	34
Age (years)		(mean \pm SD)
	Total	56.8 \pm 13.75
	Male	63.04 \pm 13.32
	Female	52.45 \pm 12.47
Cancer	<i>breast</i>	14
	<i>prostate</i>	10
	<i>lung</i>	8
	<i>bowel</i>	5
	<i>Melanoma of skin</i>	5
	<i>Brain, central nervous system</i>	3
	<i>Cervix uteri</i>	2
	<i>Thyroid</i>	2
	<i>Leukaemia</i>	2
	<i>Pancreas</i>	1
	<i>Adrenal</i>	1
	<i>Kidney</i>	1
	<i>Liver</i>	1
	<i>Larynx</i>	1
	<i>Colorectal</i>	1

Table 2. Characterization of the hematological and biochemical profile of study subjects (N=57).

	Male	Female	All subjects	RV
Rbc ($10^6/\text{mm}^3$)	4.26 ± 0.92	4.2 ± 0.51	(4.31 ± 0.75)	4.3 – 5.7
Hb (g/dL)	12.8 ± 2.84	(12.8 ± 1.4)	(12.9 ± 2.10)	13.5 – 17.5
Ht (%)	37.99 ± 7.9	37.61 ± 3.91	(38.6 ± 6.75)	39.0 – 50.0
MCV (fL)	89.51 ± 5.53	89.65 ± 5.86	89.59 ± 5.67	81.0 – 95.0
MCH (pg)	30.05 ± 2.17	30.02 ± 2.46	30.03 ± 2.33	26.0 – 34.0
MCHC (g/dL)	33.41 ± 1.45	33.49 ± 1.22	33.46 ± 1.31	29.0 – 37.0
RDW (%)	(13.15 ± 2.85)	14.06 ± 1.69	(13.4 ± 2.4)	12.0 – 15.0
Leu (mm^3)	6.420 ± 2.613	(5.000 ± 2.440)	(5.23 ± 2.76)	3.500 – 10.500
Plt (mm^3)	218.8 ± 77.49	232.5 ± 91.90	(211.0 ± 92.8)	135.000 - 450.000
CRP (mg/L)	(4.44 ± 19.06)	(1.47 ± 5.9)	(1.69 ± 9.84)	less than 1.0
HAS (g/dL)	4.38 ± 0.56	4.28 ± 0.53	4.32 ± 0.54	3.5 a 5.2
DB (mg/dL)	0.53 ± 0.25	(0.43 ± 0.19)	(0.44 ± 0.33)	less than equal to 0.30
ESR (mm)	(18.00 ± 43.00)	32.9 ± 30.07	(23.5 ± 41.75)	Male: 0 – 15 Female: 0 – 20

Data were expressed as mean ± SD or median and interquartile range (). * Statistically significant difference ($p < 0.05$) when compared with same variable male.

Abbreviations: Reference value (RV), erythrocytes (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), total leukocytes (Leu), platelets (Plt), C-reactive protein (CRP), human serum albumin (HSA), direct bilirubin (DB) and erythrocyte sedimentation rate (ESR).

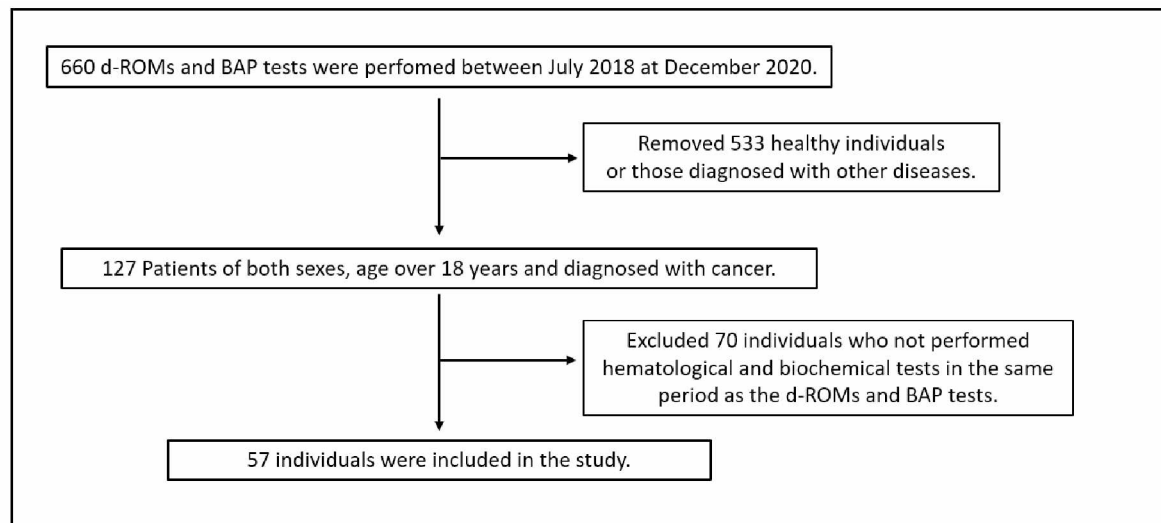
Table 3. Spearman Correlation between pairs of all subjects' variables (N=57).

	Age	dROMs	BAP	OSI	BAP/dROMs	RBC	Hb	Ht	MCV	MCH	MCHC	RDW	Leu	Plt	UA	CRP	DB	HSA	ESR
Age	r	—																	
	p	—																	
dROMs	r	-.201	—																
	p	.141	—																
BAP	r	-.245	.369**	—															
	p	.074	.006	—															
OSI	r	.081	.456**	-.538**	—														
	p	.571	.001	.000	—														
Bap/dROMs	r	-.090	-.433**	.557**	-.997**	—													
	p	.522	.001	.000	.000	—													
RBC	r	-.109	-.126	-.025	-.074	.072	—												
	p	.443	.375	.863	.614	.622	—												
Hb	r	-.098	-.310*	-.033	-.286*	.282*	.827**	—											
	p	.790	.025	.818	.047	.047	.000	—											
Ht	r	-.046	-.256	-.028	-.215	.212	.888**	.953**	—										
	p	.746	.067	.843	.138	.140	.000	.000	—										
MCV	r	.245	-.238	-.073	-.165	.166	-.418**	-.025	-.056	—									
	p	.080	.090	.609	.257	.250	.002	.859	.688	—									
MCH	r	.088	-.314*	-.102	-.252	.235	-.325*	.138	-.012	.834**	—								
	p	.534	.024	.477	.081	.101	.018	.525	.932	.000	—								
MCHC	r	-.198	-.189	-.019	-.228	.205	.086	.381**	.160	.037	.491**	—							
	p	.160	.180	.894	.116	.152	.540	.005	.254	.793	.000	—							
RDW	r	.032	.288*	.108	.210	-.212	-.354**	-.555**	-.470**	-.073	-.282*	-.374**	—						
	p	.820	.039	.451	.148	.139	.009	.000	.000	.603	.041	.006	—						
Leu	r	.217	.051	.066	.187	-.134	.003	.018	.035	-.027	-.077	-.104	-.066	—					
	p	.123	.717	.647	.199	.353	.984	.901	.802	.848	.584	.459	.638	—					
Plt	r	-.152	.551**	.224	.295*	-.310*	-.005	-.144	-.072	-.258	-.358**	-.149	.066	.289*	—				
	p	.287	.000	.118	.042	.030	.970	.308	.610	.065	.009	.293	.645	.038	—				
CRP	r	.263*	.501**	.098	.467**	-.461**	-.333*	-.439**	-.394**	-.116	-.288*	-.231	.428**	.212	.344**	-.083	—		
	p	.050	.000	.478	.000	.000	.015	.001	.003	.410	.037	.095	.001	.128	.013	.572	—		
DB	r	-.003	-.069	.224	-.283	.273	.401**	.555**	.520**	-.058	.066	.144	-.399**	-.079	-.253	.077	-.272	—	
	p	.987	.674	.165	.085	.097	.009	.000	.000	.717	.683	.370	.010	.621	.116	.643	.085	—	
HSA	r	-.377*	-.226	.091	-.396*	.358*	.430*	.531**	.510**	.038	.203	.282	-.445**	-.044	-.083	.129	-.514**	.376*	—
	p	.025	.192	.602	.023	.041	.011	.001	.002	.830	.249	.106	.008	.806	.648	.459	.001	.029	—
ESR	r	.207	.330*	-.213	.466**	-.493**	-.361**	-.454**	-.384**	.106	-.049	-.190	.264	.105	.331*	-.148	.517**	-.466**	-.361*
	p	.142	.018	.138	.001	.000	.010	.001	.006	.465	.737	.186	.064	.468	.020	.320	.000	.003	.033

* Significant correlation ($p < 0.05$); ** = Significant correlation ($p < 0.01$)

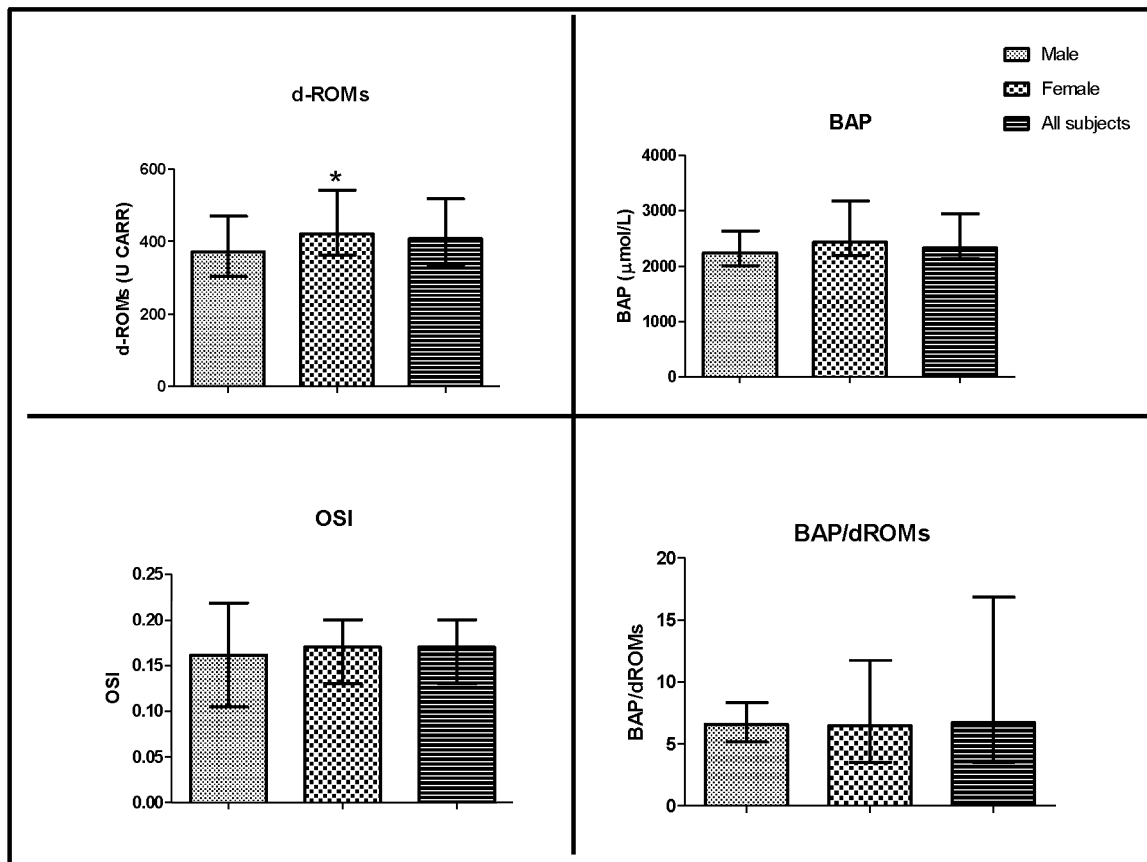
Abbreviations: Reactive oxygen metabolites (d-ROMs), biological antioxidant potential (BAP), Oxidative stress index (OSI), BAP/dROM ratio (BAP/dROM), erythrocytes (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), total leukocytes (Leu), platelets (Plt), C-reactive protein (CRP), human serum albumin (HSA), direct bilirubin (DB), erythrocyte sedimentation rate (ESR).

Figure 1. Study sample selection criteria



Abbreviations: Reactive oxygen metabolites (d-ROMs), biological antioxidant potential (BAP), Number (N).

Figure 2. Characterization of the subjects' redox balance using the d-ROMs and BAP test (N=57).



* Statistically significant difference ($p < 0.01$) when compared with same variable male.
Abbreviations: Reactive oxygen metabolites (d-ROMs), biological antioxidant potential (BAP), Oxidative stress index (OSI), BAP/dROMs ratio (BAP/dROMs).