

Luana Taquette Dalvi

**Estudo da capacidade antioxidante do polifenol ácido
elágico *in vitro* e em *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e
deficiente em superóxido dismutase 1**

BRASÍLIA

2014

Luana Taquette Dalvi

**Estudo da capacidade antioxidante do polifenol ácido
elágico *in vitro* e em *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e
deficiente em superóxido dismutase 1**

**Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Nutrição
Humana pela Faculdade de Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima

BRASÍLIA

2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima

(Orientador - IB / UnB)

DR. Carlos Bloch

(Embrapa)

Prof. Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

(IB / UnB)

Prof. Dr. Alexis Fonseca Welker

(UnB / Ceilândia)

Prof. Dra. Sandra Fernandes Arruda

(PGNUT / UnB)

Dra. Élide Geralda Campos

(IB / UnB)

“Somos assim: sonhamos o vôo mas tememos a altura. Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no vazio que o vôo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas. Mas é isso o que tememos: o não ter certezas. Por isso trocamos o vôo por gaiolas. As gaiolas são o lugar onde as certezas moram.”

Fiódor Dostoiévski

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, João e Glória, por todo amor e apoio emocional;

Ao Thiago, por sua paciência, carinho e compreensão; por ser meu ponto de equilíbrio e minha voz da razão. Nunca teria finalizado esse doutorado sem o seu apoio e seus conselhos.

Ao professor Marcelo Hermes, por ter depositado sua confiança no meu trabalho e por ter acreditado na minha capacidade de finalizar esta tese, mesmo quando eu mesma não tinha certeza que conseguiria fazê-la;

Aos amigos do laboratório de radicais livres, em especial ao Daniel, pela sua importante ajuda no procedimento das análises de atividade enzimática das leveduras;

Ao Túlio e demais alunos da professora Élide, por terem me ensinado algumas técnicas de microbiologia e de como trabalhar com leveduras;

Ao técnico Francisco (Chiquinho) do laboratório de Biofísica, por exercer de forma correta e pro-ativa o seu trabalho, ajudando sempre quando era solicitado.

Aos membros da banca, por terem aceitado meu convite e por analisarem o trabalho desenvolvido nessa tese.

A CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa;

Ao CNPq e ao Milênio-Redoxoma, por terem fomentado os projetos de pesquisa desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Radicais Livres (GPRO) do qual eu faço parte.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Radicais livres – efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs) em moléculas biológicas.....	2
2.2 - Papel do ferro na formação de EROs.....	4
2.3 - Regulação do metabolismo de ferro em <i>S. cerevisiae</i>	5
2.4 - Sistema de defesa antioxidante.....	9
2.4.1 - Superóxido dismutase (SOD).....	9
2.4.2 – Catalase.....	12
2.4.3 - Peroxidases - glutathiona peroxidase (GPx) e tioredoxina peroxidase... ..	12
2.4.4 - Sistema redox de grupo tiol.....	13
2.5 - Regulação da resposta ao estresse oxidativo em <i>S. cerevisiae</i>	16
2.6 - Ácido elágico.....	19
3 - OBJETIVO GERAL.....	22
3.1 - Objetivos específicos.....	22
4 - Capítulo 1: Estudo <i>in vitro</i> da capacidade quelante de Fe ³⁺ do polifenol ácido elágico.....	24
4.1 – Introdução.....	24
4.2 - Materiais e Métodos.....	27
4.2.1 – Reagentes.....	27
4.2.2 - Dano oxidativo à 2-desoxiribose (2-DR).....	28
4.2.3 - Análise espectrofotométrica do complexo AE-ferro.....	28
4.2.4 – Cinética de consumo de oxigênio.....	29
4.3 - Resultados	29
4.3.1 - Efeito do tempo de pré-incubação no potencial antioxidante do AE.....	29
4.3.2 - Efeito antioxidante do AE na presença de diferentes ligantes de	

ferro.....	31
4.3.3 - Efeito da concentração de AE no dano oxidativo à 2-DR mediado por Fe ³⁺ -citrato e ascorbato.....	33
4.3.4 - Efeito do AE na cinética de consumo de oxigênio em meio reacional contendo diferentes ligantes de ferro.....	34
4.3.5 - Análise da cinética de formação do complexo ferro-AE na presença de diferentes ligantes de ferro.....	36
4.4 – Discussão e conclusão.....	37
5 - Capítulo 2: Estudo da atividade antioxidante do ácido elágico em <i>S. cerevisiae</i> selvagem e deficiente em SOD1.....	43
5.1 – Introdução.....	43
5.2 – Materiais e métodos.....	45
5.2.1 - Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> e condições de crescimento.....	45
5.2.2 - Curva de crescimento das linhagens selvagem e deficientes em SOD... ..	45
5.2.3 - Determinação da concentração de menadiona a ser utilizada nos ensaios.....	47
5.2.4 - Ensaio experimental.....	48
5.2.5 - Viabilidade celular.....	48
5.2.6 - Concentração de glutatona total e reduzida.	48
5.2.7 - Permeabilidade de membrana analisada por citometria de fluxo.....	50
5.2.8 - Concentração de ergosterol e peróxidos lipídicos por HPLC.....	51
A) Foto-oxidação do ergosterol.....	52
5.2.9 - Atividades enzimáticas.....	53
A) Preparo do homogenato.....	53
B) Atividade Glutathione-S-transferase.....	53
C) Atividade Glutathione peroxidase total	54
D) Atividade Glutathione redutase	54
E) Atividade glicose-6-fosfato desidrogenase e isocitrato desidrogenase.....	55
F) Atividade Aconitase.....	55
G) Proteínas solúveis totais.....	56
5.2.10 - Análise estatística	57
5.3 – Resultados.....	57
5.3.1 - Efeito da concentração de menadiona na viabilidade celular nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> selvagem e deficientes em SOD.....	57
5.3.2 - Efeito da incubação prévia com o polifenol AE na viabilidade de	

leveduras selvagem e deficiente em SOD1 tratadas com menadiona.....	59
5.3.3 - Efeito do AE na concentração de glutathiona total e oxidada em leveduras selvagem e deficiente em SOD1 tratadas com menadiona.....	63
5.3.4 - Atividade aconitase.....	65
5.3.5 - Análise da permeabilidade de membrana analisada por citometria de fluxo.....	67
5.3.6 - Análise de lipídios oxidados por HPLC.....	69
5.3.7 - Atividade de enzimas antioxidantes.....	73
5.4 – Discussão.....	76
6 – Conclusão.....	86
7 - Considerações finais.....	86
7 – Referências bibliográficas.....	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

·OH	Radical hidroxil
2-DR	2-desoxi-D-ribose
A	Absorbância
Asc·	Radical ascorbil
Asc	Ácido ascórbico, ascorbato
AE	Ácido elágico
AT	Ácido cafeico
CAT	Catalase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DFO	Desferral
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HEPES	Ácido n-(2-hidroxietyl)piperazina-n'-(2-etenosulfônico)
HOO·	Radical hidroperoxil
LO·	Radical alcolxil
LOO·	Radical peroxil
LOOH	Radical hidroperóxido
KPi	Tampão fosfato
MDA	Malonaldeído (ou malonil dialdeído)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NTA	Ácido nitrilotriacético
O₂^{·-}	Ânion radical superóxido
PIH	Piridoxal isonicotinoil hidrazona
Pi	Fosfato inorgânico
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
WT	Levedura selvagem
Δsod1	Levedura deficiente na enzima SOD1
Δsod2	Levedura deficiente na enzima SOD2
Δsod1Δsod2	Levedura deficiente nas enzimas SOD1 e SOD2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de regulação em resposta a deficiência de ferro em <i>S. cerevisiae</i>	8
Figura 2: Participação das Grx3p, Grx4p e Grx5p na regulação da homeostase de ferro e na construção dos grupamentos Fe-S.....	16
Figura 3: Mecanismo de regulação envolvendo o fator de transcrição Yap1 da <i>S. cerevisiae</i> em resposta ao estresse oxidativo.....	18
Figura 4: Estrutura do ácido elágico.....	19
Figura 5: Efeito da variação da concentração de AE na degradação oxidativa da 2-desoxiribose (Resultados retirado de Ginani, 2005).....	26
Figura 6: Efeito do tempo de pré-incubação do AE com Fe ³⁺ -EDTA no potencial antioxidante do AE.....	30
Figura 7: Efeito protetor do AE na reação de oxidação da 2-DR mediada por ascorbato e Fe ³⁺ complexado a diferentes ligantes.....	32
Figura 8: Velocidade da reação de oxidação da 2-DR na presença de diferentes ligantes de ferro.....	32
Figura 9: Efeito da concentração de AE na degradação oxidativa da 2-DR.....	34
Figura 10: Velocidade de consumo de oxigênio obtido na presença de Fe ³⁺ -EDTA ou Fe ³⁺ -citrato.....	35
Figura 11: Cinética de formação do complexo ferro-AE realizado na ausência ou na presença de diferentes ligantes.....	36
Figura 12: Efeito da concentração de AE na produção de radical ascorbil (Retirado de Ginani 2005).....	38
Figura 13: Cinética de formação do complexo Fe ²⁺ -Ferrozina na presença de AE e Fe ³⁺ (Retirado de Ginani 2005).....	39
Figura 14: Curva de crescimento das linhagens selvagem, Δ sod1, Δ sod2 e Δ sod1 Δ sod2 de <i>S. cerevisiae</i>	46
Figura 15: Efeito da fase de crescimento na sensibilidade da levedura selvagem ao estresse com 15 μ M de menadiona.....	47
Figura 16: Amostra de levedura preparado com 50% de células vivas e 50% de células mortas marcadas com 50 μ g/mL de IP.....	51

Figura 17: Foto representativa do ensaio de viabilidade das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> crescidas em meio YPD ágar após tratamento com diferentes concentrações de menadiona.....	58
Figura 18: Efeito da concentração de AE na viabilidade de leveduras selvagem e Δ sod1 tratadas com 15 μ M de menadiona.....	60
Figura 19: Efeito da incubação prévia com 250 μ M de DFO na viabilidade das linhagens selvagem e deficiente em SOD1 tratadas com 15 μ M de menadiona...	61
Figura 20: Efeito da incubação prévia com 50 μ M de AE na viabilidade da levedura Δ sod1 tratada com 5 μ M de menadiona.....	62
Figura 21: Valores relativos de glutathiona total (GSH-eq) e oxidada (GSSG) em leveduras selvagem e Δ sod1.....	64
Figura 22: Efeito da menadiona e do AE na atividade aconitase da levedura selvagem e Δ sod1.....	67
Figura 23: Gráficos representativos do efeito da adição de 15 e 30 μ M de menadiona na permeabilidade de membrana de leveduras selvagem e Δ sod1.....	68
Figura 24: Cromatogramas obtidos de alíquotas de solução de 100 μ L de ergosterol puro e ergosterol fotossensibilizado por 5 e 30 minutos.....	70
Figura 25: Cromatogramas obtidos em 210 nm dos lipídios extraídos das amostras de levedura selvagem e Δ sod1.....	71
Figura 26: Cromatogramas obtidos em 283 nm dos lipídios extraídos das amostras de levedura selvagem e Δ sod1.....	72
Figura 27: Área do pico do ergosterol (tempo de retenção de 10,9 minutos) analisado em 283 nm.....	72
Figura 28: Atividade GR, GPx e GST das amostras de leveduras selvagem e Δ sod1.....	74
Figura 29: Atividade G6PDH, ICDH das amostras de leveduras selvagem e Δ sod1.....	75
Figura 30: Ciclo redox da menadiona.....	76

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reações da peroxidação lipídica.....	3
Esquema 2: Sistema gerador de radical hidroxil utilizado no estudo de Ginani, 2005.....	25
Esquema 3: Hipóteses do mecanismo de proteção do AE em sistema gerador de radical hidroxil mediado por Fe^{3+} e ascorbato.....	40
Esquema 4: Inativação da aconitase pelo $O_2^{\bullet-}$ com a liberação de Fe^{2+} do grupamento Fe-S.....	66
Esquema 5: Hipótese para a diminuição da atividade aconitase em levedura $\Delta sod1$	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais genes alvo do AFT1 e localização celular e função da proteína correspondente.....	7
Tabela 2: Valores absolutos da concentração de glutathiona total (GSH-eq) e GSSG e da razão GSSG/GSH-eq encontrados nas linhagens selvagem e $\Delta sod1$	65

Resumo

O ácido elágico (AE) é um polifenol presente em frutas vermelhas e castanhas que tem sido estudado nas últimas duas décadas devido suas propriedades antioxidante, antimutagênica e anticarcinogênica. Apesar disso, ainda não se sabe ao certo como seria o mecanismo antioxidante do AE *in vitro* ou *in vivo*. Portanto, nós primeiramente investigamos a capacidade do AE de quelar íons Fe^{3+} na presença de diferentes ligantes de ferro (EDTA, citrato e NTA). O mecanismo quelante do AE foi correlacionado com sua atividade antioxidante. O AE apresenta uma pequena proteção contra a degradação da 2-desoxiribose induzida por Fe^{3+} -EDTA e ascorbato, alcançando apenas 12% de proteção com 50 μ M de AE. Entretanto, ao utilizar citrato ou NTA, ligante que formam complexos mais fracos com o Fe^{3+} , a proteção aumenta para 80% e 45%, respectivamente. Além disso, o efeito antioxidante do AE é dependente do tempo de pré-incubação na presença de uma razão 1:1 de Fe^{3+} -EDTA, o que sugere novamente mecanismo quelante. AE apresenta uma maior inibição da taxa de consumo de oxigênio na presença de Fe^{3+} -citrato do que na presença de Fe^{3+} -EDTA. Nossos resultados estão de acordo com os espectros de formação do complexo ferro-AE, os quais demonstram que o AE remove Fe^{3+} do EDTA de forma mais lenta do que na presença de citrato (1h x 1 min, respectivamente). Essa diferença na taxa de complexação pode explicar o efeito antioxidante encontrado nesses sistemas. Em seguida, nós analisamos o efeito do AE contra o estresse induzido por menadiona em linhagens de levedura selvagem (WT) e deficiente em SOD1 (Δ sod1). Em condição controle, sem a adição de menadiona, AE melhora a viabilidade da linhagem Δ sod1 de forma dose dependente. Além disso, o tratamento com 50 μ M de AE em ambas as linhagens WT e Δ sod1 aumenta a viabilidade da célula incubada com menadiona. O estresse induzido pela menadiona aumenta, em 10 vezes, os níveis de GSSG da linhagem Δ sod1 (devido a oxidação de GSH) enquanto que nenhum efeito é observado na linhagem selvagem. A administração de AE aumenta os níveis de glutatona total nas duas linhagens (60-90% de aumento), assim como promove diminuição na formação de GSSG na levedura Δ sod1 tratada com menadiona. A atividade de enzimas antioxidantes como GPx e GR são afetadas pelo tratamento com menadiona e pela suplementação com AE. Como já era de se esperar, a atividade GPx está aumentada na linhagem Δ sod1 quando comparado com a WT. Atividade GR, por outro lado, está significativamente aumentada na presença de menadiona e AE. Atividade aconitase é conhecida como sensor da presença de radical superóxido na célula, uma vez que esse radical remove o íons de ferro do seu sítio ativo, inativando a enzima. Tratamento com menadiona diminui a atividade aconitase da linhagem Δ sod1, que não é prevenida pela suplementação com AE. Aparentemente, essas linhagens de levedura apresentam um controle rigoroso da integridade de membrana, uma vez que análises em FACS mostraram que não há alterações relevantes na permeabilidade de membrana após tratamento com menadiona em ambas as linhagens. Mais ainda, análises por HPLC não detectaram mudanças nos níveis de peroxidação lipídica ou mesmo na concentração de ergosterol. Ao todo, os resultados sugerem que o AE apresenta efeito protetor contra o estresse induzido por menadiona evidenciado pela melhora da viabilidade celular e pela prevenção da oxidação de GSH. Nossos resultados também demonstram que o AE é capaz de modular a atividade de enzimas antioxidantes induzindo o sistema antioxidante endógeno da levedura.

Palavras chave: ácido elágico, antioxidante, ferro, levedura, superóxido dismutase

Abstract

Ellagic acid (EA) is a polyphenol present in berries and nuts that has been subject of research over the past two decades due to its antioxidant, antimutagenic and anticarcinogenic properties. Despite that, it is still unclear its antioxidant mechanism *in vitro* and *in vivo*. With this in mind, we first investigated the capacity of EA to chelate Fe^{3+} ions in the presence of different iron ligands (EDTA, citrate and NTA). The chelating mechanism of EA was then correlated to its antioxidant activity. EA has a small protection against 2-deoxyribose degradation induced by Fe^{3+} -EDTA and ascorbate, reaching only 12% of protection with 50 μM EA. However, using citrate or NTA, ligands that are known to form weaker complexes with Fe^{3+} , the protection increases to 80% and 45%, respectively. In addition, the antioxidant effect of EA is dependent on the pre-incubation period only when employing a 1:1 Fe^{3+} -EDTA, suggesting again a chelating mechanism. EA presents a better inhibitory effect on the oxygen consumption rate in the presence of Fe^{3+} -citrate when compared to Fe^{3+} -EDTA. Our results are in agreement with spectroscopic analyses of iron-EA complexes, which demonstrate that EA removes Fe^{3+} from EDTA slower than from citrate (1 h and 1 min, respectively). The difference in the complexation rate could help explaining the antioxidant effects of EA in these systems. We then analyzed the effects of EA against a menadione-induced oxidative stress using both wild-type (WT) and SOD1 deficient (Δsod1) yeast strains. Under control conditions, in the absence of menadione, EA already improves Δsod1 viability in a dose-dependent manner. Moreover, the treatment with 50 μM EA in both WT and Δsod1 strains increases their viability when incubated with menadione. The stress caused by menadione increases, by 10 fold, the GSSG levels in Δsod1 strain (due to GSH oxidation), while no effect is observed in the WT strain. Supplementation with EA, on the other hand, induces an increase in the levels of total-GSH in both strains (by about 60%-90%) as well as it induces a decrease in GSSG formation in the Δsod1 strain stressed with menadione. The activity of antioxidant enzymes such as GPx and GR are affected by menadione treatment and by supplementation with EA. Not surprisingly, GPx activity is increased in the Δsod1 strain when compared to the WT. GR activity, on the other hand, is significantly increased in the presence of both menadione and EA. Aconitase activity is a known sensor of the presence of superoxide radicals in the cell, since it removes iron ions from the active site, inactivating the enzyme. Treatment with menadione led to a decrease in the aconitase activity in the Δsod1 strain, which is not prevented by the supplementation with EA. Apparently, these yeast strains have a strict control of the membrane integrity, since FACS analyses showed no relevant alterations after menadione treatment in both strains. Moreover, HPLC experiments did not detect major changes in lipid peroxidation levels or ergosterol concentration in both strains. Altogether, these results suggest that EA presents protective effects against menadione-induced oxidative stress, which were demonstrated by the improvement of cell viability and the prevention of GSH oxidation. Our results also demonstrate that EA can modulate the activity of antioxidant enzymes, improving the endogenous antioxidant system.

Keywords: ellagic acid, antioxidant, iron, yeast, superoxide dismutase

1. Introdução

Nas últimas décadas, os estudos sobre os mecanismos de ação de fitoquímicos ganharam destaque no meio acadêmico científico. O interesse a respeito dos fitoquímicos começou após estudos epidemiológicos mostrarem correlação inversa entre o consumo de frutas e hortaliças e a incidência de doenças cardiovasculares e câncer (Hertog et al., 1993; Steinmetz et al., 1996; Liu et al., 2000). Dentre os fitoquímicos estudados, os compostos fenólicos denominados polifenóis se destacaram devido sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica (Chung et al., 1998; Ferguson, 2001; Prior, 2003).

Os estudos *in vitro* mostram que os polifenóis apresentam uma atividade antioxidante significativa tanto por um mecanismo sequestrador de radicais livres quanto por mecanismo quelante de íons metálicos (Yoshino & Murakami, 1998; Wei et al., 2006). Apesar dos polifenóis serem conhecidos pelo seu potencial antioxidante, muitos pesquisadores questionam se essas moléculas teriam de fato papel antioxidante *in vivo* (Lotito & Frei, 2006; Stevenson & Hurst, 2007). Tal questionamento se deve principalmente a baixa concentração plasmática (na faixa micromolar) descrita em estudos sobre biodisponibilidade de polifenóis, o que impediria uma ação antioxidante direta (Scalbert et al., 2002; Manach et al., 2004). Por outro lado, estudos *in vivo* realizados com polifenóis mostram que esses compostos possuem outros mecanismos de ação dentro da célula que não estariam relacionados com uma atividade antioxidante direta. Dentre os efeitos citados, incluem a modulação de fatores de transcrição como o NF- κ B, AP-1 e Nrf2, a inibição da proliferação celular e da resposta de quimiocinas, e também poderia agir como um ligante de receptores nuclear (Stevenson & Hurst, 2007; Virgili & Marino, 2008).

Apesar de haver hoje uma reinterpretação do mecanismo de ação desses polifenóis *in vivo*, acredita-se que mesmo presente em baixa concentração, os polifenóis poderiam agir como quelante de íons metálicos *in vivo*. Estudos mostram que a concentração intracelular de ferro “livre”, também conhecido como ferro quelável, encontra-se em torno de 10^{-6} a 10^{-7} M (Petrat et al., 2000; Kakhlon & Cabantchik, 2002). Sabe-se que o ferro quelável possui papel importante para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula (Stohs & Bagchi, 1995). Portanto, a presença de moléculas quelantes, tais como os polifenóis, poderia prevenir o dano oxidativo proveniente da participação do ferro quelável. Vale

ressaltar que compostos quelantes são efetivos mesmo presente em pequenas concentrações, o que corrobora com a hipótese do mecanismo quelante de polifenóis *in vivo*.

Nosso interesse é analisar como polifenóis agem em sistemas contendo maior concentração intracelular de ferro quelável. Escolhemos para o estudo o polifenol ácido elágico (AE) que apresentou um potencial antioxidante *in vitro* satisfatório em estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (Ginani, 2005; Dalvi, 2008). Resultados *in vitro* mostraram que o ácido elágico inibe os danos oxidativos a 2-desoxirribose (2-DR) causado por reagentes de Fenton e Fe(III)/Cu(II)+ascorbato. A ação antioxidante do ácido elágico foi atribuída à sua capacidade de ligar íons metálicos e de sequestrar radical hidroxil (Ginani, 2005; Dalvi, 2008).

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo corresponde ao estudo químico da capacidade do AE de quelar íons Fe³⁺ na presença de diferentes ligantes de ferro. O segundo capítulo corresponde ao estudo da ação do AE em leveduras deficientes em superóxido dismutase (SOD) submetidas ao estresse com menadiona. A escolha desse modelo experimental foi feita após verificarmos na literatura que as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em SOD apresentam naturalmente maior concentração de ferro quelável e que o estresse com menadiona favorece ainda mais o acúmulo desse ferro quelável. Ao final do trabalho, foram levantadas hipóteses a respeito dos benefícios de uma dieta contendo fontes alimentares de AE.

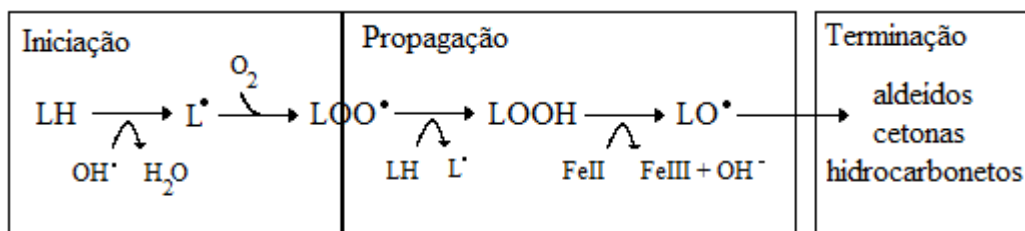
2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Radicais livres – efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs) em moléculas biológicas

Sabe-se que a origem de várias patologias, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, câncer, diabetes, doenças inflamatórias e o processo de envelhecimento natural, está relacionada ao aumento dos danos oxidativos causados pelos radicais livres (Hermes-Lima, 2004b; Cadenas & Davies, 2000). O radical livre é caracterizado por possuir um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais energético, o que faz com que algumas espécies apresentem baixa estabilidade, tornando-se bastante reativos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Entre os radicais livres produzidos no nosso organismo, as espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem destaque devido a sua abundância e alta reatividade. Um dos sítios mais relevantes de sua formação é na mitocôndria, onde 0,1% do oxigênio consumido é parcialmente reduzido, formando intermediários reativos, como ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\cdot OH$) (Halliwell & Gutteridge, 2007; Cadenas & Davies, 2000). Dentre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil é a mais reativa, sendo capaz de reagir com a maioria das biomoléculas com constantes de velocidade que variam de 10^7 a $10^{10} M^{-1} s^{-1}$ (Hermes-Lima, 2004a; Halliwell & Gutteridge, 2007).

O radical hidroxil pode reagir com a membrana das células levando à peroxidação dos fosfolipídios. A peroxidação lipídica danifica a membrana, alterando sua fluidez e até mesmo levando à ruptura da mesma (Halliwell & Gutteridge, 2007). O início da peroxidação lipídica se dá pela abstração do hidrogênio do ácido graxo insaturado formando um lipídio radicalar (L^{\cdot}). Em seguida, uma molécula de oxigênio é adicionada ao lipídio radicalar gerando o radical lipoperoxil (LOO^{\cdot}). O radical lipoperoxil é responsável pela propagação da cadeia de reações da peroxidação lipídica, uma vez que este radical também é capaz de abstrair o hidrogênio dos ácidos graxos insaturados adjacentes formando o hidroperóxido lipídico ($LOOH$). O término da peroxidação lipídica é caracterizado pela decomposição das espécies radicalares e do $LOOH$ formando aldeídos (principalmente malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE)), cetonas, álcoois e gases de hidrocarbonetos (como etano, propano, pentano e hexano) (Savin & Balmori, 2008). O MDA formado na peroxidação lipídica possui efeito carcinogênico e mutagênico podendo reagir com proteínas e ácidos nucleicos do DNA formando adutos estáveis (Marnett, 2000). O HNE também reage rapidamente com proteínas, ligando-se ao grupamento tiol ($-SH$), e com o grupo amino das bases do DNA (Halliwell & Gutteridge, 2007).



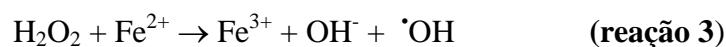
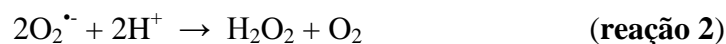
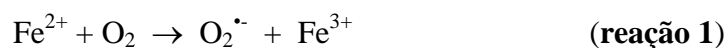
Esquema 1: Reações da peroxidação lipídica.

O DNA também pode ser oxidado pelo $\cdot\text{OH}$ que reage com o açúcar deoxirribose e as bases purinas e pirimidinas. O $\cdot\text{OH}$, ao ser adicionado ao carbono C-8 da base guanina do DNA, forma o aduto 8-hidroxi-guanina (8-OH-Gua) (Breen & Murphy, 1995). O 8-OH-Gua ocasiona a mutação do DNA por meio da transversão GC-TA (Toyokuni & Sagripanti, 1996). Além disso, a abstração de um hidrogênio da deoxirribose leva, após uma série de reações, a quebra da ligação C-C do açúcar ocasionando a fragmentação da fita de DNA (Meneghini, 1997; Breen & Murphy, 1995).

Os danos em proteínas podem ocorrer por glicosilação, pela formação de sulfóxido de metionina, s-nitrosilação, por destruição do grupamento de ferro-enxofre (Fe-S) pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$, por glutationilação, pela oxidação irreversível das cadeias laterais formando resíduos de carbonil e, possivelmente, por nitração (Halliwell & Gutteridge, 2007). A oxidação de proteínas ocorre, principalmente, nos resíduos de cisteína e metionina da estrutura protéica formando um aminoácido radical (Hermes-Lima, 2004a). O grupamento tiol presente nesses aminoácidos são facilmente oxidados por metais de transição e pelas EROs, em especial $\cdot\text{OH}$, oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HOCl), cloraminas e peroxinitrito (ONOO^-) (Halliwell & Gutteridge, 2007). A oxidação de proteínas possui um papel biológico importante, pois ocasiona danos em receptores, enzimas, proteínas transportadoras e nas proteínas responsáveis pela cascata de transdução de sinal. A oxidação das enzimas de reparo do DNA, por exemplo, pode aumentar os níveis de danos oxidativo no DNA e aumentar a frequência de mutações (Halliwell & Gutteridge, 2007).

2.2 - Papel do ferro na formação de EROs

Os íons metálicos, em especial o ferro, possuem papel importante na produção de radical hidroxil no organismo. Já se sabe, por exemplo, que íons de ferro provocam danos em sítios específicos no DNA e em proteínas, e intensificam a propagação da peroxidação lipídica (Stohs & Bagchi, 1995; Fraga & Oteiza, 2002; Gaetke & Chow, 2003; Toyokuni & Sagripanti, 1996). O íon ferroso pode reduzir o H_2O_2 formando ânion hidroxila e radical hidroxil (**reação 3**, conhecida como reação de Fenton). Além disso, pode ser oxidado pelo oxigênio gerando $\text{O}_2^{\cdot-}$ (**reação 1**), que posteriormente pode levar a formação de radical hidroxil via reação de Fenton (Hermes-Lima, 2004a).



Apesar de participar de reações formadoras de espécies reativas, o ferro é um elemento essencial para todos os eucariotos incluindo animais, plantas e fungos. Ele participa da estrutura de diversas proteínas e tem papel fundamental na ação delas no organismo. Como componente do grupo heme, o ferro é indispensável para o transporte de oxigênio para os tecidos. Além disso, é o elemento chave para reações de oxi-redução catalisadas pelos citocromos (na cadeia transportadora de elétrons), pela aconitase (no ciclo de Krebs), xantina oxidoreductase (no ciclo do ácido úrico) e enzimas antioxidantes como a catalase e as hemeperoxidases (Nishino & Okamoto, 2000; Halliwell & Gutteridge, 2007). Por outro lado, o excesso de ferro no organismo pode promover maior produção de EROs. Portanto, o controle na homeostase de ferro em eucariotos é fundamental para evitar possíveis danos oxidativo. Sabe-se que o acúmulo de ferro em tecidos está associado a doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doenças hepáticas e coronarianas, câncer e diabetes (Fraga & Oteiza, 2002; Gaetke & Chow, 2003; Moreira et al, 2008; Theophanides & Anastassopoulou, 2002).

O desequilíbrio na produção de radicais livres na célula também pode aumentar a concentração celular de ferro quelável. Enzimas que possuem grupamento de Fe-S, como a aconitase, são alvos do radical superóxido. O ataque radicalar ao grupamento Fe-S leva à liberação do ferro da estrutura da enzima, disponibilizando-o para reações redox produtoras de EROs (Imlay, 2006). Além disso, a remoção do íon de ferro leva à inativação da enzima, comprometendo vias metabólicas importantes (Tong & Rouault, 2007).

O estudo *in vivo* proposto nesse trabalho foi realizado em cultura de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Os tópicos dessa revisão relacionados com metabolismo de ferro e controle antioxidante foram escritos levando-se em consideração somente tal organismo. Sua comparação com demais organismos eucariotos não é o foco dessa revisão.

2.3 - Regulação do metabolismo de ferro em *S. cerevisiae*.

O influxo de ferro em *Saccharomyces cerevisiae* ocorre por meio de diferentes transportadores presentes na parede celular e na membrana citoplasmática. O ferro presente no meio encontra-se na forma de sais férricos, quelatos férricos ou mesmo ligado a pequenas moléculas orgânicas chamadas sideróforos (sid-Fe³⁺) produzidas por bactérias e fungos, como por exemplo, a desferroxamina (DFO) produzida por *Streptomyces pilosus* (Kaplan & Kaplan, 2009). *S. cerevisiae* não é capaz de produzir sideróforos, porém pode capturá-los por meio de transportadores denominados FIT1, FIT2 e FIT3 presentes na parede celular. Ao atingir a membrana plasmática, os íons Fe³⁺ são reduzidos por ferroredutases (FRE) a Fe²⁺, e este último é transportado pelo sistema transportador de ferro de alta afinidade composto por uma multi-cobre oxidase (FET3) e uma permease transmembrânica (FTR1) (Kaplan & Kaplan, 2009; Philpott & Protchenko, 2008). A FET3 é uma enzima semelhante a ceruloplasmina que oxida os íons ferroso a Fe³⁺ que atinge o citosol. A oxidação do Fe²⁺ é dependente de oxigênio, sendo assim a captação de ferro por esse sistema está diretamente relacionada com a disponibilidade de oxigênio (Kaplan & Kaplan, 2009). O ferro ligado ao sideróforo pode ser transportado na forma de ferricromo pelas famílias de transportadores ARN/SIT ou ser reduzido pela FRE se desligando do seu sideróforo (Kaplan & Kaplan, 2009; Philpott & Protchenko, 2008). Além desses transportadores, *S. cerevisiae* dispõe de mais dois transportadores de ferro de baixa afinidade, FET4 e SMF1, que também transportam outros metais de transição como Mn²⁺ e Zn²⁺. Uma vez dentro da célula, o ferro é encaminhado para diferentes compartimentos da célula, onde será utilizado principalmente como componente da estrutura de proteínas. O ferro excedente é armazenado no vacúolo na forma de Fe³⁺ (Kaplan & Kaplan, 2009; Philpott & Protchenko, 2008).

O controle primário da homeostase de ferro em *S. cerevisiae* é feito pelo fator de transcrição ferro-dependente AFT1. O AFT1 é expresso de forma constitutiva e encontra-se no citosol quando o ferro está abundante. Porém, quando há deficiência de ferro, o AFT1 é transportado para o núcleo pelo transportador PSE1 onde ativa a transcrição de genes que favorecerão o influxo de ferro para dentro da célula e a remoção do ferro estocado no vacúolo (veja na tabela 1 os genes alvos do AFT1). Quando a concentração intracelular de ferro é restabelecida, o AFT1 é exportado do núcleo, inativando a transcrição dos genes alvo (Kaplan & Kaplan, 2009; Philpott & Protchenko, 2008) (para maiores detalhes, vide figura 1 e 2 que mostram o mecanismo de regulação de ferro pelo AFT1).

Em condições de deficiência de ferro, a célula rearranja seu metabolismo sintetizando menos proteínas que contém ferro em sua estrutura incluindo as heme-proteínas e as proteínas que contém grupamento de Fe-S. Nessa condição de deficiência, vias metabólicas como o ciclo do ácido tricarboxílico, a cadeia de transporte de elétrons e a biossíntese de determinados compostos (heme, alguns aminoácido e biotina) ficam comprometidas (Kaplan & Kaplan, 2009; Philpott & Protchenko, 2008). Um dos mecanismos responsável pela diminuição de tais vias é a ativação da transcrição do gene CTH2 pelo AFT1. O CTH2 é uma proteína que se liga a mRNAs específicos, reconhecendo uma região que não é transcrita, rica em adenina e uracila. Ao se ligar a essa região o CTH2 leva a desestabilização e degradação do mRNA, impedindo sua transcrição (Kaplan & Kaplan, 2009; Philpott & Protchenko, 2008).

Tabela 1: Principais genes alvo do AFT1 e localização celular e função da proteína correspondente.

Categoria	Gene (nome)	Localização	Função
Captação de ferro para dentro da célula	FIT1-3	Parede celular	Liga/capta sideróforo
	FRE1 e FRE2	MP	Metaloredutase
	FRE3	MP	Sideróforo redutase
	FET3	MP	Multi-cobre oxidase – capta Fe ²⁺
	FTR1	MP	Permease – capta Fe ²⁺
	ARN1	MP e endossomo	Transportador ferricromo
	ARN3/SIT1	MP e endossomo	Transportador sideróforo hidroxamato
Efluxo de ferro do vacúolo para o citosol	FRE6	Vacúolo	Metaloredutase
	FET5	Vacúolo	Multi-cobre oxidase – transportador de Fe ²⁺
	FTH1	Vacúolo	Permease de Fe ²⁺
Adaptação metabólica à baixa concentração de ferro	HMX1	RE	Heme oxigenase
	CTH2/TIS11	Citosol	Degrada RNAm

MP – membrana plasmática

RE – retículo endoplasmático

Outro mecanismo usado pela levedura para mobilizar mais ferro em período de deficiência é o aumento da transcrição do gene HMX1 da enzima heme oxigenase, responsável pela degradação do grupo heme e liberação do ferro (Kaplan & Kaplan, 2009; Philpott & Protchenko, 2008).

Quando o aporte de ferro encontra-se adequado, o ferro sobressalente é estocado no vacúolo. O transporte do ferro para dentro do vacúolo ocorre por meio da proteína CCC1 que é regulada pelo fator de transcrição Yap5. Ao contrário do observado com AFT1, a transcrição de CCC1 pelo Yap5 é regulada pelo excesso de ferro na célula, favorecendo assim, o acúmulo de ferro para dentro do vacúolo (Kaplan & Kaplan, 2009). A diminuição da concentração de ferro intracelular leva a ativação dos genes regulados pelo AFT1, como, por exemplo, o CTH2 que promove a degradação do mRNA do CCC1. Esse mecanismo impede que, em condição de deficiência, o ferro seja transportado para dentro do vacúolo, diminuindo ainda mais o ferro citosólico (Kaplan & Kaplan, 2009).

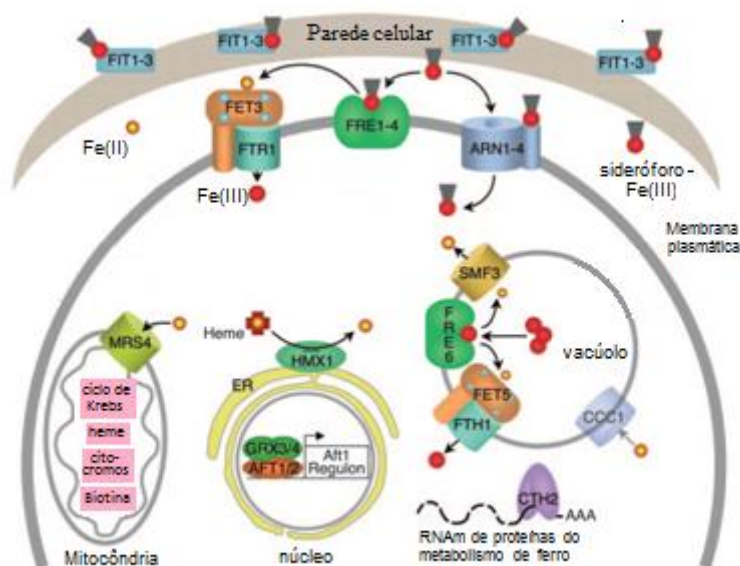


Figura 1: Mecanismo de regulação em resposta a deficiência de ferro em *S. cerevisiae*. Em condição de deficiência de ferro, o fator de transcrição AFT1 promove a transcrição de genes envolvidos: **a**) na captação de ferro para dentro da célula (tais como FIT1-3; FRE1-4, FET3, FTR1 e ARN1-4); **b**) na disponibilização do ferro estocado no vacúolo (FET5, FTH1 e FRE6); **c**) na degradação de mRNA de proteína que contém ferro em sua estrutura (CTH2); e **d**) na degradação do grupo heme para liberação do ferro (HMX1). Adaptado de Philpott & Protchenko, 2008.

2.4 - Sistema de defesa antioxidante

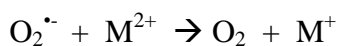
De modo geral, as células apresentam certa tolerância aos danos oxidativos provocados pelos radicais livres. Essa tolerância ocorre devido ao sistema de defesa antioxidante que o organismo dispõe e que promove um equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes.

O mecanismo antioxidante pode ser dividido em duas grandes categorias: enzimático e não-enzimático. Os antioxidantes não enzimáticos agem sequestrando os radicais livres, impedindo, dessa forma, a oxidação de proteínas, lipídios e do DNA. Além disso, podem complexar íons metálicos, inibindo a capacidades destes de participar de reações redox formadoras de radicais livres. Alguns desses antioxidantes não-enzimáticos são produzidos pelas células, como por exemplo, a glutathiona (GSH), coenzima Q, metalotioneína e tioredoxinas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Outros antioxidantes podem ser adquiridos na dieta (por animais e seres humanos) ou adicionados no meio celular. As vitaminas C, E e A, assim como os carotenóides possuem efeitos antioxidantes *in vivo*. Moléculas que complexam ferro, produzidas por bactérias e fungos (sideróforos), também são consideradas importantes antioxidantes no caso de leveduras, uma vez que se ligam ao ferro impedindo a produção de EROs. Os sideróforos podem ser estocados junto com o ferro no vacúolo ou serem utilizados como transportadores de ferro no citosol (Philpott & Protchenko, 2008).

O sistema antioxidante enzimático é composto por um conjunto de enzimas que catalisam a redução dos radicais livres através da transferência de elétrons, normalmente, via hidrogênio (Toledano et al., 2003). Os antioxidantes enzimáticos incluem: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GPx), tioredoxina peroxidase, entre outros. As enzimas glutathiona redutase (GR), tioredoxina redutase (TRR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) dão suporte às enzimas antioxidantes e, portanto, também fazem parte do sistema antioxidante enzimático

2.4.1 - Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) converte o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a H_2O_2 e O_2 . Essa dismutação é catalisada por metais de transição como o cobre e o manganês.



S. cerevisiae contem duas isoformas de SOD: uma Cu,Zn-SOD (Sod1p), localizada no citosol, no espaço intermembrânico e em outros compartimentos celulares; e uma Mn-SOD (Sod2p), presente na matrix mitocondrial (Toledano et al., 2003). As duas SOD possuem papel importante na dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ porém, a perda de Sod1p promove consequências mais dramáticas do que a perda de Sod2p. Em condição de crescimento aeróbico, a linhagem de levedura deficiente em Sod1p (Δsod1) apresenta comprometimento no crescimento, auxotrofia por lisina e metionina (ou seja, perde a capacidade sintetizar tais aminoácidos), baixo crescimento em substratos respiratórios (glicerol ou etanol), alta taxa de mutação, rápida perda de viabilidade em fase estacionária e são altamente sensíveis a drogas que sofrem ciclo-redox produzindo EROs como o paraquat e a menadiona. A mutante deficiente em Sod2p (Δsod2) também possui baixa taxa de crescimento em substratos respiratórios e maior sensibilidade ao paraquat. A dupla mutação de sod1 e sod2 ($\Delta\text{sod1} \Delta\text{sod2}$) leva a um comprometimento mais severo que intensifica a deficiência em ambos os fenótipos (Longo et al., 1996; Corson et al., 1999; De Freitas et al., 2000; Srinivasan et al., 2000; Wallace et al., 2004; Sehati et al., 2011).

Além das alterações supracitadas, a deficiência de SOD em leveduras ocasiona um aumento de ferro livre detectado por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (do inglês, EPR), o que pode levar a fragmentação do vacúolo (Srinivasan et al., 2000; Corson et al., 1999). Além disso, a suplementação de ferro (0,3 e 1 mM) no meio contendo fonte de carbono não-fermentável (glicerol) favorece o crescimento da linhagem deficiente em sod1 (De Freitas et al., 2000).

O mecanismo proposto para as alterações no fenótipo de leveduras deficientes em SOD está relacionado com a toxicidade do radical superóxido dentro da célula. Sabe-se que o radical superóxido reage rapidamente com os grupamentos de Fe-S presentes em certas enzimas, promovendo a liberação do ferro e inativação da enzima (Halliwell & Gutteridge, 2007). Além da inativação da enzima, o “ferro livre” pode produzir radical hidroxil via reação de Fenton, acarretando oxidação dos demais componentes celulares. Após a inativação dessas enzimas pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$, a célula necessita de ferro para reparo e/ou reconstrução de novos

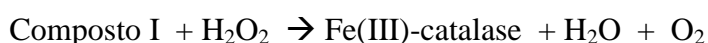
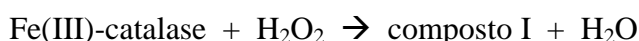
grupamentos de Fe-S. O estudo de De Freitas e colaboradores (2000) mostrou que leveduras Δ sod1 apresentam maior transcrição do gene FET3 responsável pelo transporte de ferro para dentro da célula. Essa característica provoca aumento no conteúdo intracelular de ferro detectado por ICP-MS (De Freitas et al., 2000).

A auxotrofia por lisina e metionina também está relacionada com o estresse oxidativo em leveduras. A biossíntese de lisina é dependente da enzima homoaconitase, homólogo à aconitase, que também contém grupamento de Fe-S. Portanto, essa enzima também pode ser inativada por radical superóxido (Wallace et al., 2004; Zyracka et al., 2005). A auxotrofia por metionina está relacionada com a depleção de NADPH necessária para síntese desse aminoácido e com a inativação da enzima sulfito redutase (que também possui grupamento de Fe-S) presente na via de biossíntese da metionina (Wallace et al., 2004). Além de promover a auxotrofia de metionina, a inativação dessa enzima também promove acúmulo de sulfito, substância tóxica, principalmente em mutantes Δ sod1 (Wallace et al., 2004; Zyracka et al., 2005). A auxotrofia por lisina e metionina é abolida com a adição de moléculas antioxidante tais como ascorbato e glutatona (Zyracka et al., 2005).

Acredita-se que o uso de quelantes de ferro possa minimizar os danos oferecidos pelo radical superóxido em células deficientes em SOD, uma vez que parte do dano oxidativo pode ser atribuído à produção de ROS mediado pelo ferro liberado da estrutura dos grupamentos de Fe-S. Um estudo realizado com *Escherichia coli* deficiente em SOD mostrou que uso de supressores pleiotrópico (os genes *dapD* e *dapB*) minimizam parte do fenótipo defeituoso da bactéria, como, por exemplo, a auxotrofia por aminoácidos aromáticos, sulfurados e de cadeia ramificada. Os genes *dapD* e *dapB* codificam respectivamente as enzimas tetraidrodiacopilinato succinilase e dihidrodipicolinato redutase e sua supressão leva o acúmulo de dipicolinatos no citosol. O estudo com tais mutantes mostrou que dipicolinatos se ligam ao ferro intracelular acumulando ferro no interior da célula (Maringati & Imlay, 1999). Segundo esse estudo, especula-se que o dipicolinato seja capaz de capturar o ferro liberado dos grupamentos de Fe-S de bactéria deficiente em SOD, reciclando-os para a construção de novos grupamentos de ferro (Maringati & Imlay, 1999).

2.4.2 - Catalase

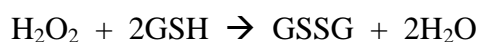
A catalase é uma Fe(III)-heme proteína que decompõe duas moléculas de H₂O₂ a O₂ e duas moléculas de água (H₂O). O primeiro H₂O₂ é reduzido à H₂O, formando composto I (Fe⁵⁺) e o segundo é oxidado formando H₂O e O₂ (Halliwell & Gutteridge, 2007).



S. cerevisiae contém uma catalase citosólica (Ctt1p) e uma catalase peroxissomal (Cta1p). A deleção de uma ou das duas catalases não altera o crescimento e a sensibilidade ao H₂O₂ em fase exponencial. Porém, em fase estacionária, a linhagem contendo a dupla mutação ($\Delta\text{cta1}\Delta\text{ctt1}$) possui maior sensibilidade ao H₂O₂ quando comparado com o tipo selvagem e a linhagem com mutação simples (Toledo et al., 2003; Herrero et al., 2008). Isso indica que a catalase de levedura age como um importante antioxidante em fase estacionária.

2.4.3 - Peroxidases - glutathiona peroxidase (GPx) e tioredoxina peroxidase

A glutathiona peroxidase também possui papel importante na remoção de H₂O₂, porém, este oxida duas moléculas de glutathiona (GSH) para reduzi-lo à água. Além dessa atividade clássica, algumas GPx (conhecidas como PHGPx – glutathiona peroxidase de hidroperóxido de fosfolípido) são capazes de catalisar a redução de hidroperóxidos lipídicos e demais hidroperóxidos sintéticos como o t-butil hidroperóxido (t-BOOH) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

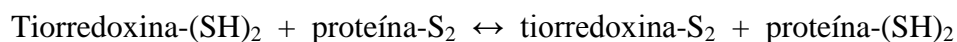


Três isoformas de GPx foram identificadas em *S. cerevisiae* (Gpx1, Gpx2 e Gpx3). As três isoformas reduzem hidroperóxido de fosfolipídio *in vitro*. Além disso, linhagem deficiente nas três isoformas possui sensibilidade ao ácido linolênico na ausência de um antioxidante, indicando que tais GPx possuem atividade PHGPx *in vivo*. Dentre as três isoformas, a Gpx3p possui papel mais importante, uma vez que possui maior atividade *in vitro* e a mutação correspondente apresenta o fenótipo mais característico (Toledano et al., 2003; Herrero et al., 2008).

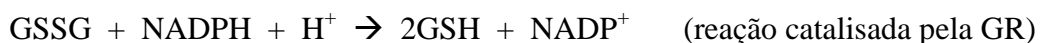
A tioredoxina peroxidase, também conhecida como peroxirredoxina (PRX), reduz peróxidos e peroxinitritos utilizando, em especial, as tioredoxinas como doadores de elétrons. Porém, algumas PRX também utilizam a GSH como agente redutor (Herrero et al., 2008). *S. cerevisiae* possui 5 isoformas de PRX: 3 citosólicas (cTPxI – gene Tsa1; cTPxII – gene Tsa2; cTPxIII – gene Ahp1), 1 mitocondrial (mTPx – gene Prx1) e 1 nuclear (nTPx – gene Dot5) (Herrero et al., 2008).

2.4.4 - Sistema redox de grupo tiol.

O sistema redox de grupo tiol é mantido por duas vias, uma por glutatona (GSH) e outra pela tioredoxina (Trx). Em ambos os sistemas, o NADPH possui papel primordial para doar H, reduzindo tanto a glutatona quanto as tioredoxinas oxidadas (Toledano et al., 2007; Herrero et al., 2008). As glutaredoxinas e as tioredoxinas reduzem as ligações dissulfeto em troca da oxidação do resíduo de cisteína formando um dissulfeto.

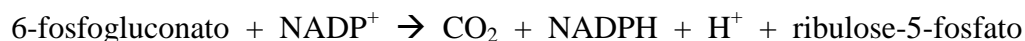
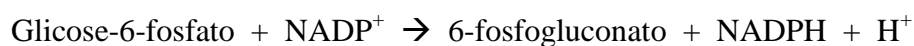


Após serem oxidadas, as glutaredoxinas e as tioredoxinas são novamente reduzidas, porém elas seguem vias distintas para sua redução. As tioredoxinas são reduzidas pela enzima tioredoxina redutase (TRR) dependente de NADPH, enquanto as glutaredoxinas são reduzidas diretamente pela GSH (Halliwell & Gutteridge, 2007). A glutatona oxidada (GSSG) é então convertida novamente à GSH por meio da ação da glutatona redutase (GR – gene *glr1*), também dependente de NADPH.



Tiorredoxina-S₂ + NADPH + H⁺ → NADP⁺ + tiorredoxina-(SH)₂ (reação catalisada pela TRR)

O aporte de NADPH é garantido pela via das pentoses fosfato. A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH – gene *zwf1*) regula o fluxo de carbono para via e é o primeiro passo que leva a redução do NADP⁺. Em seguida, a enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (gene *gnd1*) forma o segundo NADPH (Halliwell & Gutteridge, 2007).



Tiorredoxinas

As tiorredoxinas possuem papel fundamental no balanço redox da célula: 1) evitam o acúmulo tóxico de ligações dissulfeto no citoplasma e 2) reparam as proteínas danificadas que são essenciais para sua viabilidade (Grant, 2001). *S. cerevisiae* possui duas tiorredoxinas (Trx1 e Trx2) citosólicas e uma (Trx3) mitocondrial e uma tiorredoxina redutase (Trr1) no citosol e outra (Trr2) na mitocôndria (Toledano et al., 2003; Toledano et al., 2007; Carmel-Harel & Storz, 2000). As tiorredoxinas possuem papel importante na síntese de DNA, uma vez que são responsáveis pela redução da enzima ribonucleotídeo redutase (RNR) que forma uma ligação dissulfeto quando reduz os ribonucleotídeos à deoxiribonucleotídeos (Toledano et al., 2003; Toledano et al., 2007). Além disso, linhagens com deleção em *trx1* e *trx2* ($\Delta\text{trx1}\Delta\text{trx2}$) possuem auxotrofia por aminoácidos sulfurados devido ao defeito da levedura em assimilar sulfato causando acúmulo de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS). A inativação da via de assimilação de sulfato ocorre pela incapacidade da célula em reduzir a enzima PAPS redutase que é dependente das tiorredoxinas (Toledano et al., 2003; Toledano et al., 2007; Herrero et al., 2008).

Glutaredoxinas

As glutaredoxinas utilizam a GSH como substrato redutor. Ao contrário da levedura *Schizosaccharomyces pombe*, a *S. cerevisiae* possui alta tolerância à glutatona oxidada. Mais de 60% da glutatona encontra-se oxidada em linhagem Δ glr1 (Muller, 1996). Isso indica que a GSSG não é tóxica para *S. cerevisiae* e que a GR não é essencial para levedura. Recentemente, foi demonstrado que a levedura *S. cerevisiae* rapidamente compartimentaliza a GSSG que não é imediatamente reduzida no citosol para o vacúolo, o que, em parte, explica a sua alta tolerância à GSSG (Morgan et al., 2013). Porém, linhagens que não produzem GSH (com deleção no gene *gsh1* referente à γ -glutamilcisteína sintetase da síntese de GSH) são inviáveis tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas, tornando-se auxotróficos para GSH (Toledo et al., 2007). A super-expressão de tioredoxina nessa linhagem é capaz apenas de atrasar a parada de crescimento, aliviando em parte a dependência por GSH exógena (Sharma et al., 2000). A atribuição da GSH como molécula essencial não está relacionada exclusivamente com o estresse oxidativo ou mesmo com a síntese de DNA e a assimilação de sulfato, mas sim com a construção dos grupamentos de Fe-S (Toledo et al., 2007).

S. cerevisiae possui duas glutaredoxinas (Grx1p e Grx2p) que são capazes de reduzir a enzima RNR, porém de forma menos eficiente que as tioredoxinas, uma vez que linhagem Δ trx1 Δ trx2 apresenta uma fase S extensa (Toledo et al., 2007). As demais glutaredoxinas (Grx3p, Grx4p e Grx5p) possuem papel fundamental na construção dos grupamentos de Fe-S e na regulação da homeostase de ferro. A deleção da glutaredoxina mitocondrial Grx5p, assim como a depleção de glutatona ou de frataxina mitocondrial (Yfh1p) leva à perda da biossíntese dos grupamentos de Fe-S e a inativação ferro-dependente do Aft1p, o que ocasiona acúmulo de ferro intracelular (Philpott & Protchenko, 2008). Além disso, as formas nucleares de glutaredoxina, Grx3p e Grx4p, também possuem papel importante na inativação do Aft1p (Ojeda et al., 2006). Especula-se que durante a biogênese mitocondrial dos grupamentos de Fe-S um composto desconhecido é exportado da mitocôndria pelo transportador ATM1 e atinge o núcleo formando dímeros de Aft1p envolvendo também Grx3p e Grx4p. A dimerização do Aft1p é reconhecida pelo exportador nuclear Msn5p que direciona o Aft1p para o citosol (figura 2) (Philpott & Protchenko, 2008).

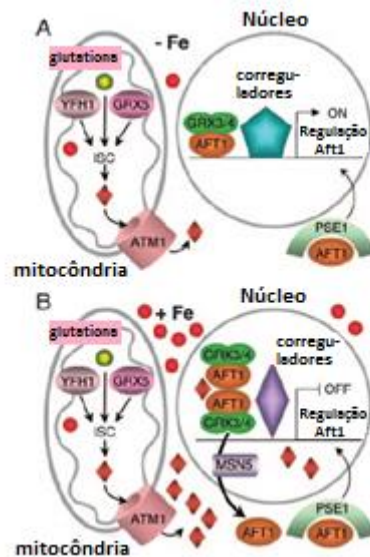


Figura 2: Participação das Grx3p, Grx4p e Grx5p na regulação da homeostase de ferro e na construção dos grupamentos Fe-S. A) Em condição ferro deficiente, o Aft1p é transportado para o núcleo e ativa a transcrição de genes alvos. B) Aumento de ferro intracelular favorece a biossíntese de grupamento de ferro formando um composto desconhecido que atinge o núcleo, promovendo a dimerização do complexo Aft1p-Grx3p-Grx4p e a exportação do Aft1p para o citoplasma. Adaptado de Philpott & Protchenko, 2008.

2.5 - Regulação da resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae*

Em condições de estresse, o aumento intracelular de H_2O_2 age como sinalizador para a transcrição de genes envolvidos no sistema antioxidante a fim de restabelecer o balanço redox da célula. A resposta ao estresse em *S. cerevisiae* envolve uma série de fatores de transcrição, como o Yap1p, Skn7p e Msn2/4p, sendo este último relacionado principalmente ao estresse ambiental (Lee et al., 1999; Herrero et al., 2008; Lushchack, 2010; Lushchack, 2011). O Yap1p e o Skn7p cooperam em parte com a resposta ao peróxido. Skn7p participa do aumento da transcrição de genes envolvidos no sistema das tiorredoxinas, porém, não age no mecanismo de defesa dependente de GSH nem na via das pentoses, enquanto que o Yap1p é requisitado em todos os casos (Lee et al., 1999; Herrero et al., 2008; Toledano et al., 2003). O Msn2/4p induz a expressão de 2 genes de enzimas antioxidantes – a catalase citosólica (Ctt1) e a glutaredoxina 1 (Grx1) (Herrero et al., 2008; Toledano et al., 2003, Lushchack, 2010).

A proteína Yap1 pertence à família dos fatores de transcrição tipo AP-1. O Yap1 é uma proteína bZip que ativa a transcrição de determinados genes por meio da sua ligação a uma sequência de DNA estabelecida (YRE – do inglês: Yap1 recognition element, também conhecido como elemento de resposta antioxidante – do inglês ARE) localizada na região promotora do gene. Yap1p contém dois domínios ricos em cisteína localizados nas regiões C- e N-terminal da proteína. O domínio C-terminal conhecido como NES (sinal de exportação nuclear, do inglês: nuclear export signal) também possui uma região rica em leucina. Alterações redox na região do NES determinam a localização celular do Yap1p (Herrero et al., 2008; Lushchack, 2011).

O Yap1p é capaz de percorrer livremente o citoplasma e o núcleo da célula. No entanto, o exportador nuclear Crm1 possui papel importante em remover o Yap1p do núcleo, redirecionando-o para o citoplasma. A remoção do Yap1p do núcleo ocorre pelo reconhecimento da região NES dessa proteína pelo Crm1 (Herrero et al., 2008; Lushchack, 2011).

O aumento do nível intracelular de H_2O_2 não é reconhecido diretamente pelo Yap1p. A oxidação de um resíduo de cisteína da glutathione peroxidase (Gpx3p) pelo peróxido é o primeiro passo dessa via de regulação. Em seguida, a Gpx3 oxidada reage com o resíduo de cisteína da região NES do Yap1p, formando uma ligação dissulfeto. Essa alteração na proteína impede sua interação com o exportador Crm1, permitindo-a permanecer no núcleo aumentando a expressão dos genes alvo (Lushchack, 2011, Herrero et al., 2008, Toledano et al., 2003). As tioredoxinas podem reduzir o Yap1p oxidado possibilitando sua remoção do núcleo pelo Crm1p. Em seguida, as tioredoxinas são reduzidas pela tioredoxina redutase (trr), que utiliza o NADPH como doador de H^+ (Lushchack, 2011).

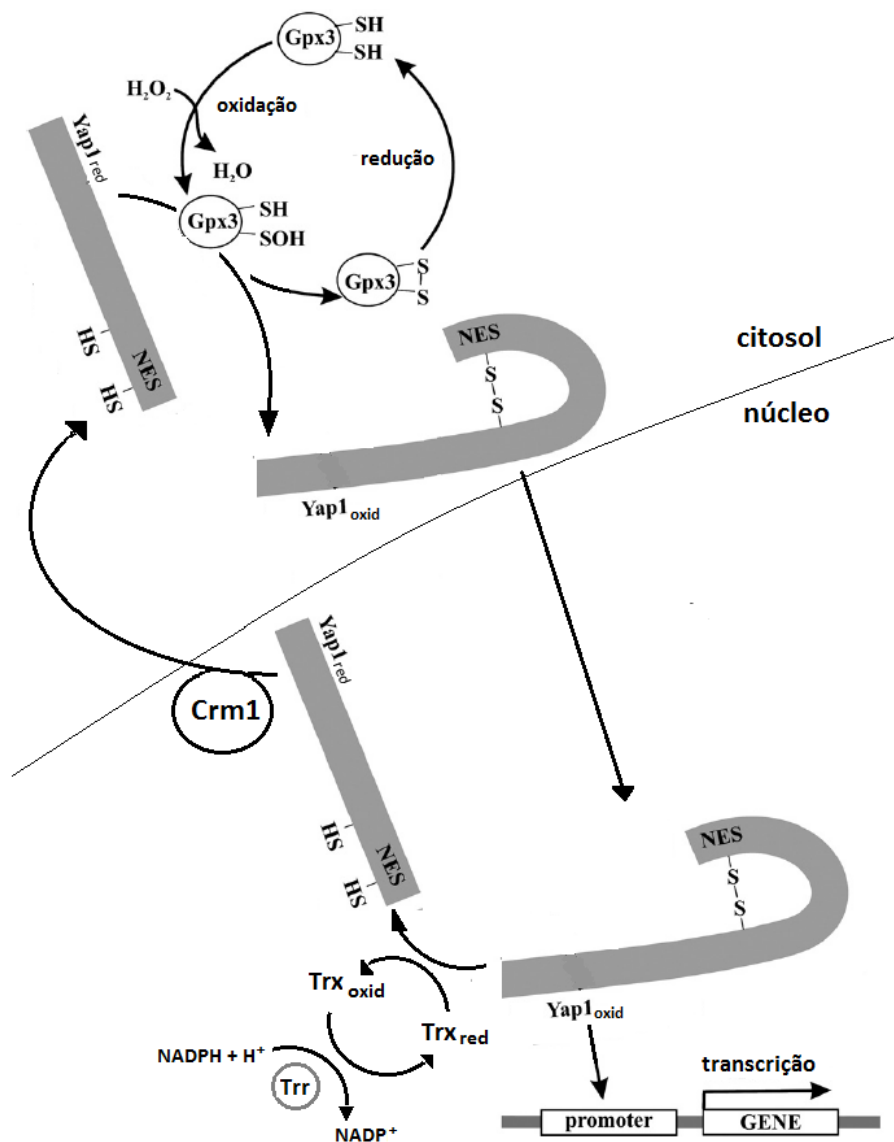


Figura 3: Mecanismo de regulação envolvendo o fator de transcrição Yap1 da *S. cerevisiae* em resposta ao estresse oxidativo. Adaptado de Lushchack 2011.

Apesar dos antioxidantes presentes no organismo auxiliarem no equilíbrio oxidativo, existe condições em que se observa um aumento na produção de radicais livres que não é acompanhado com o mesmo aumento dos antioxidantes endógenos. Esse desequilíbrio pode ocasionar uma maior oxidação dos constituintes celulares, podendo levar à morte da célula (Halliwell, 2006).

Desde a descoberta dos efeitos deletérios causados pelos radicais livres, observa-se uma busca constante de novos compostos exógenos com ação antioxidante a fim de prevenir o desenvolvimento de doenças. Nessa procura, os polifenóis ganharam destaque por estarem

presentes naturalmente na dieta humana e pela sua eficiente atividade antioxidante verificada em estudos *in vitro* e *in vivo* (Halliwell, 2007; Andrade Jr et al., 2005; Chung et al., 1998; Frei & Higdon, 2003, Fang et al., 2002).

2.6 - Ácido elágico

Formados a partir do metabolismo secundário de plantas, os polifenóis estão envolvidos na proteção contra radiação ultravioleta e patógenos agressores (Manach et al, 2004). Entretanto, sua função fisiológica não se limita apenas ao mundo vegetal. Estudos evidenciam que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos previne o desenvolvimento de diversas patologias, tais como o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Manach et. al, 2004; Chung et. al, 1998). Os efeitos biológicos dos polifenóis são frequentemente atribuídos a uma ação antioxidante direta, seja ela por mecanismos sequestrador de radicais livres ou por mecanismo quelante de íons metálicos (Virgili & Marino, 2008; Perron & Brumaghim, 2009). Entretanto, estudos mais recentes mostram que os polifenóis poderiam se ligar à proteínas e afetar a atividade de enzimas, estimular a síntese de glutathione e regular a transdução de sinal por meio da modulação de fatores de transcrição, tais como Nfr2, NF-κB e AP-1. age de forma indireta estimulando (Jakobs et al., 2006; Andreadi et al., 2006; Virgili & Marino, 2008)

O ácido elágico (AE) é um bifenol pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis. É uma molécula planar que contém quatro grupos hidroxila e dois grupos lactona (Barch et al, 1996). Esse polifenol pode ser encontrado em diversos alimentos vegetais. Algumas variedades de frutas vermelhas como morango, amora e framboesa são fontes importantes de AE. Além dessas frutas, o AE também está presente em uvas, romã e nozes (Amakura et al., 2000; Lee et al., 2005). O AE pode estar presente no tecido vegetal na forma livre ou formando grandes complexos de ácido elágico com glicose denominados elagitaninos (Atkinson et al., 2006; Häkkinen, et al., 2000).

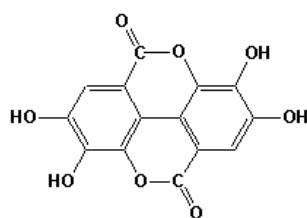


Figura 4: Estrutura do ácido elágico

Muitos autores demonstraram que o AE possui atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante (Ayrton et al., 1992; Huetz et al., 2005; Loarca-Pina et al., 1998; Priyadarsini, 2002; Ginani, 2005; Dalvi, 2008). Entretanto, os mecanismos pelos quais o AE exerce tais ações ainda não foram totalmente esclarecidos. Estudos realizados com AE contra a ação de diferentes variedades de carcinógenos (incluindo nitrosaminas, azoximetano, micotoxinas e hidrocarbonos aromáticos policíclicos) demonstraram que um dos mecanismos anticarcinogênico e antimutagênico proposto para o AE estaria relacionado com a otimização do metabolismo desses carcinógenos (Szafer et al., 2003; Loarca-Pina et al., 1998; Smith et al., 1998; Takagi et al., 1995). Os estudos indicam que o ácido elágico seria capaz de inibir a mutagênese e a carcinogênese por meio: i) da inibição de enzimas responsáveis pela bioativação de carcinógenos, como as da família do citocromo P450, ii) da estimulação de enzimas envolvidas na detoxificação de intermediários reativos, como glutathione-S-transferase, e iii) por meio da interação direta do polifenol com os intermediários reativos formando adutos inativos (Ayrton et al., 1992; Szafer et al., 2003; Barch et al., 1994; Barch et al., 1995; Barch et al., 1996; Ahn et al., 1996; Smith et al., 1998). Estudos *in vitro* demonstraram que AE também é capaz de se ligar ao DNA, o que impediria a ligação de agentes mutagênicos e carcinogênicos em alguns sítios específicos do DNA (Teel, 1986; Thulstrup et al., 1999).

A atividade do ácido elágico em modular enzimas envolvidas no metabolismo de carcinógenos foi evidenciada em diferentes estudos realizados com este polifenol. Ayrton e colaboradores (1992) demonstraram que a administração de ácido elágico intraperitoneal reduz os níveis totais de citocromo P450 em aproximadamente 50% (Ayrton et al., 1992). O mesmo foi observado no estudo de Ahn e colaboradores (1996), no qual verificou-se redução de mais 25% do total de citocromo P450 do fígado de ratos e redução de mais de 28% da atividade redutase dessa enzima após tratamento com ácido elágico. O ácido elágico também inibe a atividade hidroxilase do CYP1A1 dependente de benzo(a)pireno, enzima responsável pela ativação desse carcinógeno. A interação do ácido elágico com a enzima CYP1A1 parece estar relacionada com a estrutura desse polifenol, mais precisamente com o grupo hidroxil do carbono 4 (Barch et al., 1996).

O aumento da atividade da glutathione-S-transferase (GST) também foi demonstrado. O mecanismo envolvido nesse aumento pode estar relacionado com a indução da transcrição do gene glutathione-S-transferase pelo ácido elágico (Barch et al., 1995). Além disso, é possível que efeito do ácido elágico na GST seja específico para determinadas isoenzimas,

uma vez que nem todos trabalhos observaram aumento total de glutathiona-S-transferase (Ayrton et al., 1992; Szafer et al., 2003).

O ácido elágico também é capaz de se ligar ao DNA de forma covalente, o que impediria a ligação de agentes mutagênicos e carcinogênicos em alguns sítios específicos (Teel, 1986, Thulstrup et al, 1999). Um trabalho que analisava a formação de adutos de DNA com dibenzo(a,l)pireno (DBP) demonstrou que o ácido elágico inibe, de forma muito eficaz, em 94% a ligação desse carcinógeno ao DNA (Smith et al., 1998). A inibição da formação de adutos DBP-DNA pelo ácido elágico pode estar relacionada tanto com sua capacidade sequestradora de intermediários eletrofílicos, quanto a sua ligação direta ao DNA.

A atividade antioxidante do AE também já foi demonstrada, porém os estudos sobre este assunto ainda são escassos. Pryadarsini e colaboradores (2002), ao estudar a natureza antioxidante do ácido elágico, comprovou sua habilidade em sequestrar espécies reativas de oxigênio (radical hidroxil – $\cdot\text{OH}$), de nitrogênio (dióxido de nitrogênio – $\cdot\text{NO}_2$, peroxinitrito – ONOO^\cdot) e radical peroxil - LOO^\cdot .

Além da atividade sequestradora de radicais livres, estudos espectrofotométricos demonstram que o ácido elágico seria capaz de formar complexos insolúveis com íons metálicos como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} (Bock et al., 1981; Przewloka & Shearer, 2002). Estudos *in vitro* realizados em nosso laboratório demonstraram que a ação antioxidante do AE, em sistemas geradores de radical hidroxil mediados por Fe^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} , se deve principalmente a um mecanismo de quelação desses íons metálicos. De acordo com o estudo, a atuação do AE em concentrações micromolares e a diminuição do potencial antioxidante desse polifenol verificada com o aumento da concentração do metal sugerem fortemente um mecanismo antioxidante do tipo quelante (Ginani, 2005; Dalvi, 2008). Estudos do espectro de absorção UV-VIS do AE mostram que esse polifenol forma rapidamente complexos com tais metais de proporção 1:1 (AE:ferro ou cobre), porém, a capacidade de quelar Fe^{3+} mostrou-se comprometida na presença de EDTA, um ligante forte de ferro (Ginani, 2005; Dalvi, 2008).

Poucos estudos analisaram o efeito do AE em cultura de células utilizando íons metálicos como agente estressante. Uma série de estudos desenvolvidos por Labieniec e colaboradores, feitos em cultura de células, revelam efeitos tóxicos do AE na presença ou na ausência de Cu^{2+} ou H_2O_2 (Labieniec et al., 2003; Labieniec & Gabryelak, 2005; Labieniec & Gabryelak, 2007). A presença de AE no meio de cultura promove, de forma dose dependente (5 a 60 μM), diminuição da viabilidade celular, aumento de proteínas carboniladas e lesões

no DNA (Labieniec & Gabryelak, 2007). Entretanto, é importante ressaltar que nesse mesmo estudo, os autores observaram que 1 μM de AE promove efeito cito-protetor.

Resultados satisfatórios foram encontrados em diversos estudos que analisaram os efeitos da administração de AE em cobaias contra danos oxidativo *in vivo*. O pré-tratamento com AE mostrou ser bastante eficiente para prevenção do infarto no miocárdio induzido por isoproterenol (100 mg/kg). Segundo esse estudo, o uso de AE reduz os níveis de marcadores bioquímicos de cardiopatia (proteína C-reativa, homocisteína, troponina-I, etc) e de peroxidação lipídica, e aumenta a atividade do sistema antioxidante, proporcionando uma prevenção da necrose do miocárdio (Kannan & Quine, 2011; Kannan & Quine, 2012). Resultado semelhante também foi observado com estresse induzido por etanol (Devipriya et al., 2007).

Apesar desses estudos demonstrarem efeito antioxidante do AE *in vivo*, muitos autores questionam se os polifenóis estariam de fato agindo como um antioxidante em organismos vivos. Tal questionamento se deve ao fato que, mesmo após a ingestão de altas doses de polifenóis, esses compostos não atingem concentração plasmática suficiente para contribuir significativamente com a capacidade antioxidante total do plasma (Lotito & Frei, 2006; Scalbert et al., 2002). É importante ressaltar que existem outros compostos de baixo peso molecular que circulam na corrente sanguínea em maior concentração que possuem ação antioxidante, como o urato, o ascorbato e o tocoferol (Lotito & Frei, 2006). O AE, por exemplo, é altamente biotransformado pela microbiota intestinal formando urolitina A e B (Cerdá et al., 2003; Cerdá et al., 2005). Além disso, a pequena fração de AE que atinge a corrente sanguínea também é metabolizada por enzimas de fase II e/ou por metiltransferase (Cerdá et al., 2004; Seeram 2006). Concentração plasmática máxima de 0,1 $\mu\text{mol/L}$ de AE foi encontrado em humanos após o consumo de suco de romã contendo 25 mg de AE e 318 mg de elagitaninos (Seeram et al., 2004). Resultado semelhante também foi verificado em rato, no qual se obteve concentração plasmática máxima de 0,6 $\mu\text{mol/L}$ de AE após consumo de 68,24 μg de AE por kg de peso (Lei et al., 2003).

Por outro lado os estudos mostram que a concentração intracelular de ferro livre também é bastante baixa, na faixa de 10^{-6} a 10^{-7}M (Petrat et al., 2000; Kakhlon & Cabantchik, 2002). Portanto, acredita-se que mesmo presente em baixa concentração, moléculas quelantes como os polifenóis podem apresentar efeito protetor contra a geração de EROs mediada por ferro “livre”.

3 - Objetivo geral:

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do polifenol AE em sistemas onde o ferro possui papel fundamental na geração de EROs. O trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo apresenta um estudo químico da afinidade do AE pelos íons Fe^{3+} ; esse trabalho é a conclusão do estudo *in vitro* iniciado pela aluna Janini Ginani. O segundo capítulo mostra o efeito do AE em cultura de *S cerevisiae* selvagem e deficiente em SOD1. A escolha desse modelo de estudo se deve ao fato que os estudos com tais linhagens mostraram aumento intracelular de ferro livre em leveduras deficiente em SOD, portanto, acredita-se que o uso de quelantes de ferro poderia proporcionar efeito protetor em tais células.

3.1 - Objetivos específicos:

1. Analisar *in vitro* o potencial antioxidante do AE na presença de diferentes ligantes de ferro comparando-o com sua cinética de complexação com o íon Fe^{3+} (capítulo 1 dessa tese);
2. Avaliar a viabilidade celular de leveduras selvagem e $\Delta sod1$ estressadas com menadiona e pré-incubadas com AE.
3. Quantificar danos oxidativos utilizando biomarcadores de estresse oxidativo nas condições experimentais supracitadas;
4. Analisar a atividade de enzimas antioxidantes e verificar se a presença de AE no meio de cultura seria capaz de modular a atividade dessas enzimas.

4 - Capítulo 1: Estudo *in vitro* da capacidade quelante de Fe³⁺ do polifenol ácido elágico.

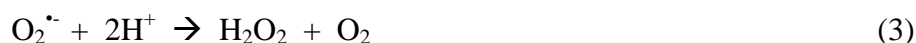
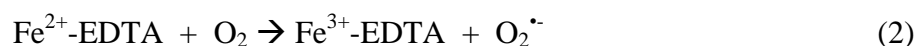
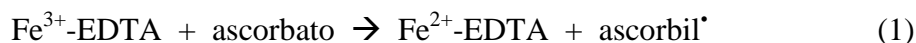
4.1 - Introdução

A importância de metais de transição na produção de radicais livres é conhecida desde 1894, quando Henry J H Fenton verificou que a combinação de H₂O₂ com íons ferrosos levava à oxidação de ácido tartárico (Fenton, 1894). Estudos realizados nos anos 70 comprovaram que íons Fe³⁺ catalizam a reação do ânion radical superóxido com o H₂O₂ levando à formação de radical hidroxil (reação proposta inicialmente por Haber e Weiss em 1934) (Fong, McCay e Poyer, 1976; Halliwell, 1978a; Halliwell, 1978b; McCord e Day, 1978). Sabe-se hoje que dentro da célula, os íons de ferro livre (ou queláveis), que compreendem o conjunto de ferro capaz de produzir radicais livres, podem promover a oxidação em sítios específicos do DNA e de proteínas e levar a propagação da peroxidação lipídica da membrana celular (Oikawa & Kawanishi, 1998; Lloyd & Phillips, 1999; Liu et al, 1999; Meneghini, 1997, Savin & Balmori, 2008).

Muitos estudos demonstraram que polifenóis apresentam capacidade quelante de íons metálicos, o que diminuiria a participação do metal na produção de radicais livres (Perrom e Brumaghim, 2009). A formação desses complexos de polifenóis com íons metálicos pode agir tanto como um mecanismo antioxidante quanto pró-oxidante. Geralmente, o mecanismo quelante de polifenóis é atribuído a um efeito antioxidante que protege o organismo contra danos no DNA e contra a peroxidação de lipídios de membrana (Yoshino & Murakami, 1998; Sestili et al., 2002; Perron & Brumagrin, 2009). Acredita-se que parte do efeito citoprotetor oferecido por polifenóis pode ser atribuído a sua capacidade de remover o ferro quelável presente dentro da célula (Morel et al., 1994).

Nosso interesse é estudar a capacidade quelante do polifenol ácido elágico (AE), um bifenol presente em frutas vermelhas como morango, amora e framboesa que possui atividades anti-carcinogênica, antimutagênica e antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Takagi et al., 1995; Khanduja et al., 1999; Priyadarsini et al., 2002). Esse trabalho oferece continuidade ao estudo desenvolvido por Janini Ginani durante seu mestrado em nosso laboratório, sobre a atividade antioxidante do ácido elágico em sistemas de geração de radicais livres mediados por íons férricos e ascorbato (vide sistema gerador de radical hidroxil no esquema 2) (Ginani, 2005). Ginani verificou que a atividade antioxidante do AE

no sistema gerador supracitado se deve a um mecanismo quelante de íons Fe^{3+} (com formação de um complexo entre AE e íons ferro) o qual diminui a participação do metal nas reações redox que levavam a oxidação de biomoléculas.



Esquema 2: Sistema gerador de radical hidroxil utilizado no estudo de Ginani, 2005.

Segundo o estudo de Ginani (2005), o AE apresenta proteção pequena em sistema gerador de radicais livres mediado por $\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}$ e ascorbato. O potencial antioxidante do AE foi analisado pela inibição da degradação oxidativa do açúcar 2-desoxiribose (2-DR) na presença do sistema gerador supracitado (para maiores detalhes vide tópico 3.1.2 do materiais e métodos desse capítulo). Os resultados obtidos no trabalho de Ginani mostram que a presença de 50 μM de AE no meio reacional (maior concentração de AE em meio tamponado) inibe apenas 12% do dano oxidativo à 2-DR. Esse resultado de proteção do AE é inferior ao obtido em outros sistemas gerador de radicais livres mediados por íons metálicos, tais como $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{Cu}^{2+}/\text{ascorbato}$, nos quais, em condições experimentais semelhante, o AE apresentou proteção de 40% e 98% respectivamente (Ginani, 2005; Dalvi, 2008). Além disso, o efeito protetor é praticamente nulo quando a concentração de EDTA é 10 vezes maior que a concentração de Fe^{3+} , o que indica que o EDTA interfere no potencial protetor do AE.

Ao realizar estudos espectrofotométricos no UV-VIS do complexo AE-Fe^{3+} , Ginani verificou que o EDTA é capaz de deslocar o ferro desse complexo de forma eficiente. A eficácia do EDTA em deslocar os íons férricos do complexo AE-Fe^{3+} foi explicada pela alta constante de afinidade do EDTA pelo Fe^{3+} (cerca de 10^{25}) (Maurício et al., 2003). Isso também explica o efeito protetor pequeno que o AE apresentou nesse sistema gerador de

radicais livres, uma vez que o AE removeria de forma muito lenta parte do Fe^{3+} ligado ao EDTA.

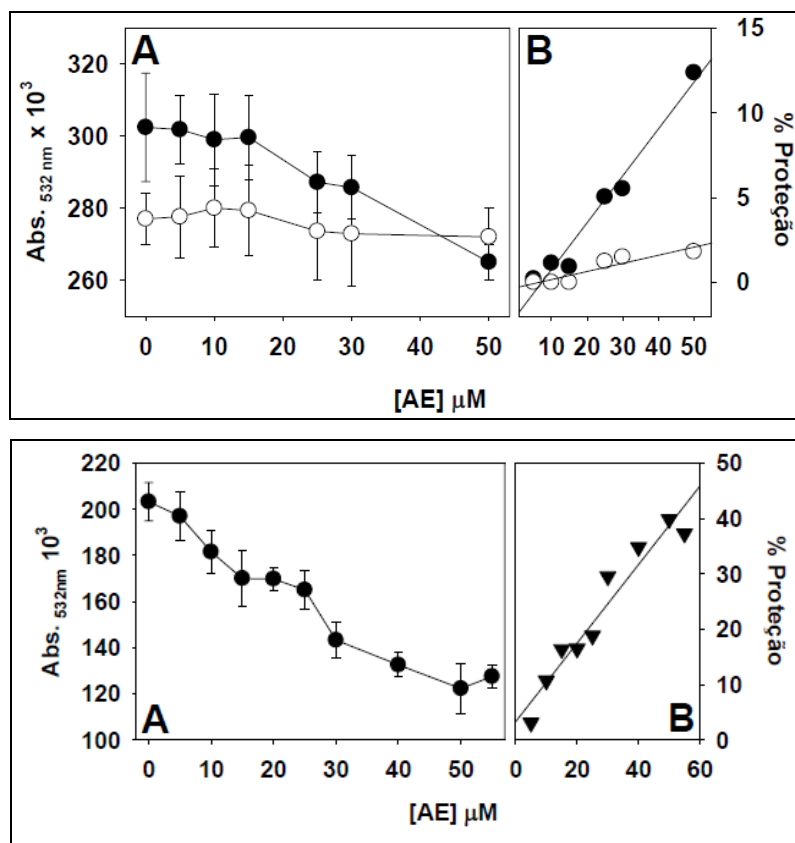
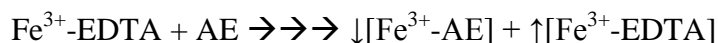


Figura 5: Resultados retirado de Ginani, 2005: Gráficos superiores: Efeito da variação da concentração de AE na degradação oxidativa da 2-desoxiribose (2-DR) mediado por Fe^{3+} -EDTA e ascorbato. Condições: 20 mM de tampão KPi (pH 7,2), 0,1 mM de ascorbato, 50 μM de Fe^{3+} -EDTA (1:1) (●, 50 μM de EDTA) ou 50 μM de Fe^{3+} -EDTA 1:10 (○, 0,5 mM de EDTA). Gráficos inferiores: Efeito da variação da concentração de AE na degradação oxidativa da 2-DR mediado por Fe^{2+} e H_2O_2 . Condição experimental: 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2), 5mM de 2-DR, AE (0-55 μM), 50 μM de Fe^{2+} e 100 μM de H_2O_2 .

Segundo estudo de Przewloka e Shearer (2002), praticamente todo ferro (>95%) é removido da solução e forma complexo com o AE em pH 7,0 (Przewloka & Shearer, 2002). A formação de complexos do AE com íons de ferro também foi observado no estudo de Ginani (2005), porém a escolha do ligante EDTA alterou a eficiência do AE em complexar o íon metálico. Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito antioxidante do

AE em sistemas geradores de radicais livres mediados por Fe^{3+} utilizando-se outros ligantes de ferro que possuam menor constante de afinidade. É importante ressaltar que o uso do ligante é fundamental para manter os íons férricos em solução em meio tamponado (pH 7,2). Na ausência do ligante, parte dos íons férricos precipita ou se liga ao tampão fosfato (Reinke et al., 1995). Nesse novo estudo, foram selecionados os ligantes NTA (ácido nitrilotriacético) e citrato. O citrato é o único ligante fisiológico escolhido no estudo e corresponde a um dos principais compostos de baixo peso molecular que complexa ferro quelável *in vivo* (Petrat et al., 2000).

4.2 - Materiais e Métodos:

4.2.1 – Reagentes

Os reagentes ácido ascórbico, ácido elágico (AE), 2-desoxi-D-ribose (2-DR), sulfato ferroso amoniacal (Fe II), fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Os demais reagentes (cloreto de ferro hexa-hidratado (Fe III), peróxido de hidrogênio, citrato de sódio, NTA e ácido fosfórico) foram adquiridos de outras empresas e possuem qualidade analítica.

A solução de ácido elágico foi preparada diariamente em 2,5 mM de tampão fosfato (pH 7,2) minutos antes de ser adicionado ao meio reacional. O ácido elágico não se solubiliza completamente em meio aquoso, sendo assim, a concentração da solução estoque foi calculada pelo coeficiente de Absortividade Molar (ϵ) do AE em meio aquoso ($\epsilon_{360\text{nm}} = (1,62 \pm 0,04) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) descrito por Bock e colaboradores (1981). A concentração da solução de AE foi analisada antes do início do experimento utilizando a equação abaixo. A solução estoque de AE descrita acima apresentava uma concentração de AE em torno de 65 a 80 μM e era preparada poucos minutos antes de ser adicionada ao meio reacional.

$$\text{Concentração estoque} = \frac{A_{360\text{nm}}}{(\epsilon_{360\text{nm}}) \times l(\text{caminho óptico}) (\text{cm})}$$

As soluções de citrato de sódio, 2-desoxi-D-ribose, ácido fosfórico e de ácido ascórbico foram preparadas em água deionizada, sendo este último preparado diariamente. As soluções de Fe(III) e de ácido tiobarbitúrico (TBA) foram preparadas diariamente em 10 mM de HCl e 50 mM de NaOH respectivamente.

4.2.2 - Dano oxidativo à 2-desoxiribose (2-DR)

Esse método tem como princípio quantificar o dano oxidativo à 2-DR pelo radical hidroxil. A degradação da 2-DR pelo radical hidroxil leva à formação de malonaldeído (MDA) que pode ser quantificado por meio de sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um aduto cromogênico (TBA₂-MDA) com pico de absorção em 532 nm (Gutteridge, 1981).

O meio reacional (0,5 mL volume final) foi composto por 20 mM de tampão fosfato (KPi) (pH 7,2), 2-DR (5 mM), Fe³⁺ previamente ligado a um coquelante (EDTA, citrato ou NTA) e AE. Os reagentes foram pré-incubados por 30 minutos, exceto no experimento de variação do tempo de pré-incubação, antes da reação ser iniciada com a adição de ácido ascórbico. A reação foi conduzida em temperatura ambiente e interrompida com adição de 0,5 mL de ácido fosfórico 4% (v/v) seguida de 0,5 mL de TBA 1% (p/v). As amostras foram aquecidas em banho-maria (98°C) por 15 minutos e a quantificação do aduto TBA₂-MDA foi realizada em espectrofotômetro.

Um controle negativo da metodologia denominado “tempo zero” foi utilizado para cada condição experimental no qual o ácido ascórbico ou o íon metálico era adicionado ao meio reacional após a adição de ácido fosfórico e TBA. A absorbância do controle “tempo zero” foi subtraída dos valores obtidos para cada condição experimental (Hermes-Lima et al., 2000).

4.2.3 - Análise espectrofotométrica do complexo AE-ferro.

O espectro de absorção do complexo ferro-AE foi realizado no espectrofotômetro Hitachi U-2001 em meio contendo 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2), 20 µM de AE e 20 µM de Fe³⁺. As leituras foram iniciadas imediatamente após a adição do Fe³⁺ ao meio e as

amostras foram feitas contra tampão fosfato (20 mM). O espectro de absorção foi realizada nos comprimentos de onda de 200 a 700 nm com intervalo de análise de 6 nm.

4.2.4 – Cinética de consumo de oxigênio

De acordo com a reação 2 do esquema 2, o íon Fe^{2+} é oxidado pelo oxigênio dissolvido no meio formando radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. A cinética dessa reação foi analisada por meio da velocidade de decaimento do oxigênio. A cinética de consumo de oxigênio foi realizada no oxígrafo (Oxygraph Plus System - Hansatech Instruments), em temperatura ambiente e 2 mL de volume final. O meio reacional foi composto de 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2), 10 e 50 μM de Fe^{3+} -EDTA ou 50 μM de Fe^{3+} -citrato (ambos ligantes foram adicionados na razão 1:1 Fe^{3+} -ligante), 50 μM de AE e 1 mM de ascorbato. Os reagentes foram pré-incubados por 5 minutos antes do início da reação promovido pela adição de ascorbato no meio. O decaimento da concentração de oxigênio foi acompanhado a partir do primeiro minuto de reação devido a instabilidade do equipamento observada durante o primeiro minuto após adição de ascorbato. A velocidade de consumo de oxigênio foi quantificada levando em consideração a taxa de decaimento da concentração de oxigênio aferida durante 5 minutos de reação. O coeficiente angular da reta foi calculado utilizando-se a fase linear do início do decaimento. A concentração inicial de oxigênio dissolvido no meio reacional foi de 220 μM , que corresponde à concentração encontrada em altitudes de 1000 metros acima do nível do mar (Hermes-Lima et al., 2001).

4.3 - Resultados

4.3.1 - Efeito do tempo de pré-incubação no potencial antioxidante do AE

O estudo de Ginani (2005) demonstrou que a atividade antioxidante do AE contra danos oxidativo à 2-DR parece ser dependente do tempo de pré-incubação do polifenol com o íon metálico, tempo este que antecede à adição de ascorbato no meio (Figura 6A e Figura 6C (●)). Ginani verificou um pequeno aumento no percentual de proteção do AE (de 5% para 12%) após 60 minutos de pré-incubação com Fe^{3+} -EDTA utilizando uma razão 1:1:1 (Fe^{3+} /EDTA/AE), o que demonstra que a cinética de remoção do ferro do EDTA é bastante lenta. A alta afinidade do EDTA pelo metal impede uma ação efetiva do AE. Sendo assim,

uma diminuição na razão Fe^{3+} -EDTA/AE poderia favorecer o potencial antioxidante do polifenol. O resultado demonstrado na figura 6B confirma a hipótese mencionada acima. O aumento no tempo de pré-incubação utilizando uma razão 1:1:5 de Fe^{3+} /EDTA/AE, ou seja com uma concentração de AE 5 vezes maior do que a de Fe^{3+} -EDTA, aumenta significativamente o percentual protetor do AE, que passa a promover 34% de proteção com 60 minutos de pré-incubação (Figura 6B e figura 6C).

O polifenol ácido tânico (AT) e o quelante piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH) também mostraram melhora no potencial antioxidante com o aumento do tempo de pré-incubação com Fe^{3+} -EDTA. O percentual de proteção do AT (150 μM) aumentou de 20% para 63% após 60 minutos de pré-incubação enquanto que o percentual de proteção oferecido por 200 μM de PIH subiu de 15% para 82% após os mesmos 60 minutos de pré-incubação (Andrade et al., 2006; Mauricio et al., 2003).

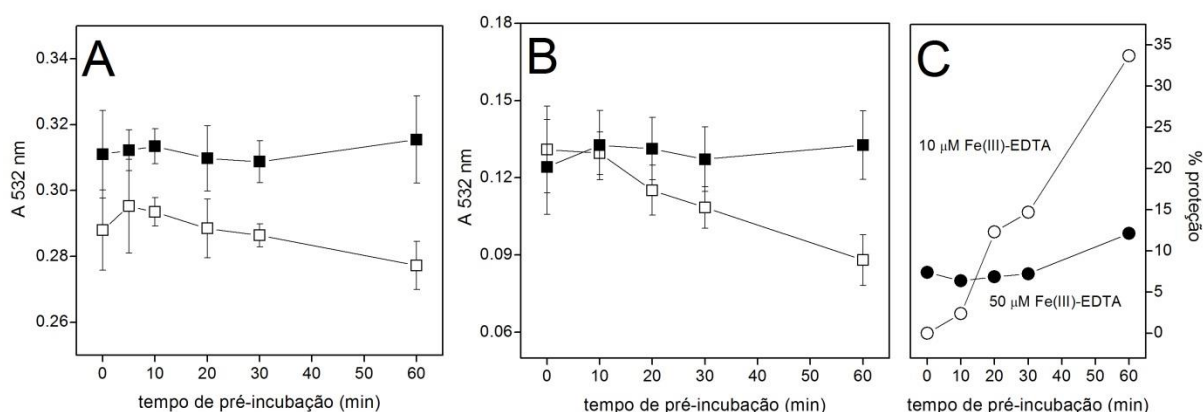
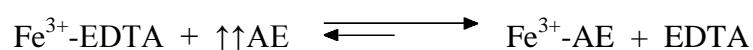


Figura 6: Efeito do tempo de pré-incubação do AE com Fe^{3+} -EDTA no potencial antioxidante do AE. Ensaio experimental realizado em 20 mM de KPi (pH 7,2), 5 mM de 2-DR, 50 μM de AE e 50 μM (**Painel A**) ou 10 μM de Fe^{3+} -EDTA (ambos na razão 1:1) (**Painel B**). O ensaio experimental foi preparado na ausência (■) e na presença de 50 μM de AE (□) (Painel A e B). Após o período de pré-incubação, a reação foi iniciada com adição de ascorbato (0,1 mM). **Painel C** corresponde aos percentuais de proteção do AE contra a degradação oxidativa da 2-DR adquiridos a partir dos dados dos painéis A e B. **Painel A retirado de Ginani, 2005.**

O aumento significativo do potencial protetor do AE observado apenas na presença de uma menor concentração de Fe³⁺-EDTA em relação à concentração do polifenol reforça a dificuldade do AE em deslocar o ferro do EDTA. A presença de uma concentração 5 vezes maior de AE em relação ao complexo Fe³⁺-EDTA favorece o equilíbrio para a formação do complexo AE-ferro, permitindo uma proteção mais efetiva do polifenol contra o dano oxidativo à 2-DR (vide esquema abaixo).



4.3.2 - Efeito antioxidante do AE na presença de diferentes ligantes de ferro.

O potencial antioxidante do AE também foi analisado na presença dos co-quelantes NTA e citrato, que formam complexos com o Fe³⁺ com uma constante de afinidade de 10⁸ e 10⁷ respectivamente (Maurice et al., 1990; Mauricio et al., 2003). A cinética de oxidação da 2-DR na presença de citrato ou NTA mostrou-se linear durante os 60 minutos de acompanhamento e é quase 10 vezes mais lenta do que na presença de EDTA (Figura 8 obtida com os dados apresentados na figura 7). Diferentemente do que é observado com o citrato e o NTA, a oxidação da 2-DR na presença de EDTA ocorre nos primeiros 20 minutos de reação e a formação de malonaldeído (MDA), produto de oxidação da 2-DR que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), mantém-se praticamente constante nos minutos subsequentes (figura 7). Desde os anos 70, já se sabe que o EDTA disponibiliza ainda mais o Fe(III) para a reação de Haber-Weiss quando comparado com a reação sem este co-quelante (Halliwell, 1978a). Esse efeito foi verificado no presente estudo pela maior produção de MDA na presença de FeIII-EDTA (Máxima Abs_{532nm} = 0,45) quando comparado com o sistema contendo citrato ou NTA (Máxima Abs_{532nm} = 0,19) (vide figura 7).

O AE possui maior potencial antioxidante na presença dos complexos Fe³⁺-citrato e Fe³⁺-NTA quando comparado com o ensaio realizado com Fe³⁺-EDTA (Figura 7). Além disso, a adição de 50 µM de AE diminui 45% e quase 90% a cinética de oxidação da 2-DR na presença de NTA e citrato, respectivamente, enquanto que no ensaio realizado com EDTA praticamente não se observa alteração na cinética da reação (Figura 8). No ensaio realizado com citrato, o AE impede de forma bem eficiente o dano oxidativo à 2-DR durante os 60 minutos de reação (proteção em torno de 65-89%). Nas mesmas condições experimentais, 50

μM de AE oferece 37-45% de proteção nos ensaios realizados com NTA e praticamente não possui efeito protetor na presença de EDTA (figura 7). A melhora do potencial antioxidante do AE na presença de citrato e NTA pode ser explicada pela maior facilidade do polifenol em deslocar o ferro desses ligantes, uma vez que estes possuem menor afinidade por íons férricos quando comparado com o EDTA.

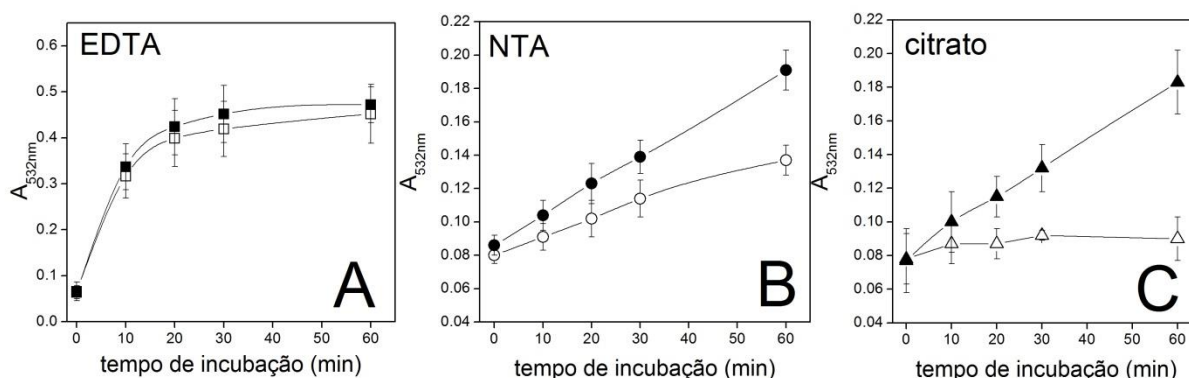


Figura 7: Efeito protetor do AE na reação de oxidação da 2-DR mediada por ascorbato e Fe^{3+} complexado a diferentes ligantes (EDTA – painel A, NTA – painel B e citrato – painel C). A reação foi conduzida em 20 mM de tampão KPi (pH 7,2), 5 mM de 2-DR, 0,1 mM de ascorbato e 50 μM de Fe^{3+} -ligante (razão 1:1). O ensaio experimental foi preparado na ausência (símbolo preto) e na presença de 50 μM de AE (símbolo branco) e pré-incubado por 30 minutos antes da adição de ascorbato.

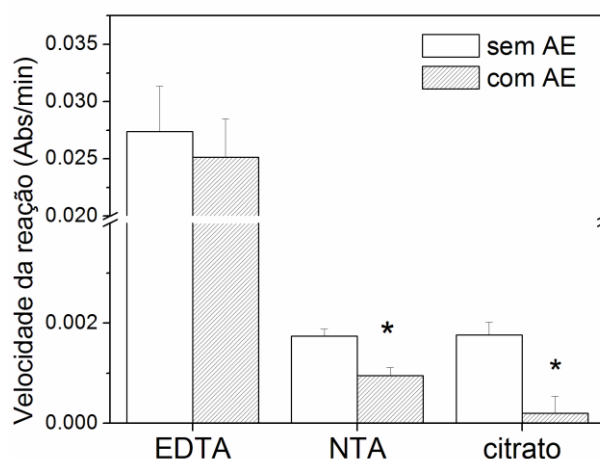


Figura 8: Velocidade da reação de oxidação da 2-DR na presença de diferentes ligantes de ferro. Velocidade extraída da figura 7 por meio do coeficiente angular da reta adquirida no período de aumento linear do dano. *significativamente diferente em relação ao ensaio realizado sem AE ($p < 0,05$) (Teste t).

Outros antioxidantes quelantes como a mangiferrina, o ácido tânico (AT) e o piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH) também apresentaram maior potencial antioxidante em sistema contendo Fe^{3+} -citrato ou Fe^{3+} -NTA quando comparado com Fe^{3+} -EDTA (Pardo-Andreu et al., 2006; Andrade et al., 2006; Mauricio et al., 2003), o que corrobora o mecanismo quelante sugerido para o AE na presença de íons férricos.

4.3.3 - Efeito da concentração de AE no dano oxidativo à 2-DR mediado por Fe^{3+} -citrato e ascorbato.

O resultado apresentado na figura 9 mostra que o efeito protetor do AE é dependente da sua concentração no meio reacional. A adição de 50 μM de AE no meio reacional contendo 50 μM de Fe^{3+} -citrato ofere 97% de proteção, inibindo quase que totalmente o dano oxidativo à 2-DR (Figura 9). Cabe ressaltar que, nestas condições, a proteção foi alcançada em uma razão 1:1 ferro-AE, sugerindo a formação de um complexo com o ferro de razão 1:1. Além disso, a eficiência do AE provavelmente independe da concentração de ascorbato no meio reacional, uma vez que seu percentual de proteção apresentou um perfil semelhante com 0,1 e 0,5 mM de ascorbato (figura 9B).

O ensaio de variação da concentração de AE permite calcular o valor de I_{50} do antioxidante que corresponde à concentração do polifenol capaz de inibir 50% do dano oxidativo à 2-DR. Os valores de I_{50} de AE obtidos nos ensaios contendo 0,1 e 0,5 mM de ascorbato foram de 24,8 e 29,5 μM , respectivamente, concentração que também corresponde aproximadamente à metade da concentração de ferro no meio. Os valores de I_{50} reforça novamente a formação do complexo ferro-AE de razão 1:1. Além disso, o valor de I_{50} em concentração micromolar indica que o AE age como um antioxidante por meio de um mecanismo quelante, uma vez que o íon metálico também está presente no meio em concentração micromolar. Moléculas exclusivamente sequestradoras de radicais livres competem com a molécula alvo (2-DR) pelo radical hidroxil. Em condições experimentais semelhantes, moléculas sequestradoras de radicais livres apresentariam efeito protetor em concentrações milimolares, uma vez que a molécula alvo (2-DR) também se encontra em concentração milimolar no meio reacional. Sendo assim, a presença de poucos micromolares desse antioxidante dificilmente teria capacidade de competir com a 2-DR pelo radical hidroxil (Lopes et al., 1999).

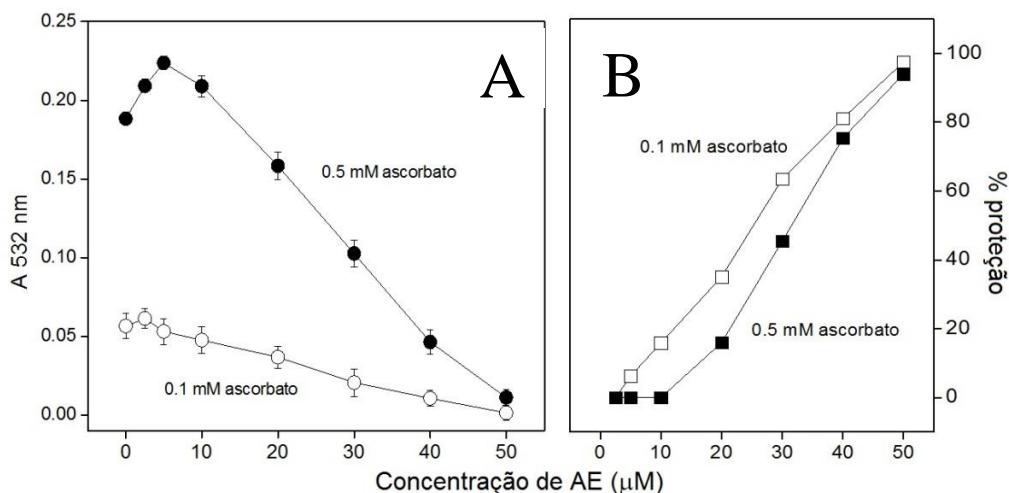


Figura 9: A) Efeito da concentração de AE na degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) mediado por 50 μM de Fe³⁺-citrato (razão 1:1) e 0,1 mM (□) ou 0,5 mM de ascorbato (■). O meio reacional foi pré-incubado por 30 minutos antes da adição de ascorbato. B) Percentual de inibição da degradação da 2-DR pelo AE.

4.3.4 - Efeito do AE na cinética de consumo de oxigênio em meio reacional contendo diferentes ligantes de ferro.

A diminuição da concentração de oxigênio presente no meio reacional é reflexo da auto-oxidação do Fe²⁺ (reação 2 do esquema 2) que foi produzido na reação de redução do Fe³⁺ pelo ascorbato (reação 1). A auto-oxidação do Fe²⁺ tem papel fundamental para o sistema gerador EROs mediada por Fe³⁺ e ascorbato uma vez que fornece O₂^{•-} ao meio que, em seguida irá se dismutar espontaneamente formando H₂O₂. A produção de H₂O₂ permite que seja gerado no meio reacional o radical hidroxil (•OH) que é a EROs com maior poder oxidativo capaz de reagir com a maioria das biomoléculas em uma constante de velocidade na faixa de 10⁷ a 10¹⁰ M⁻¹ s⁻¹ (Hermes-Lima, 2004). Portanto, a diminuição da cinética dessa reação leva a uma menor produção de radical hidroxil e, conseqüentemente, uma menor oxidação da 2-DR.

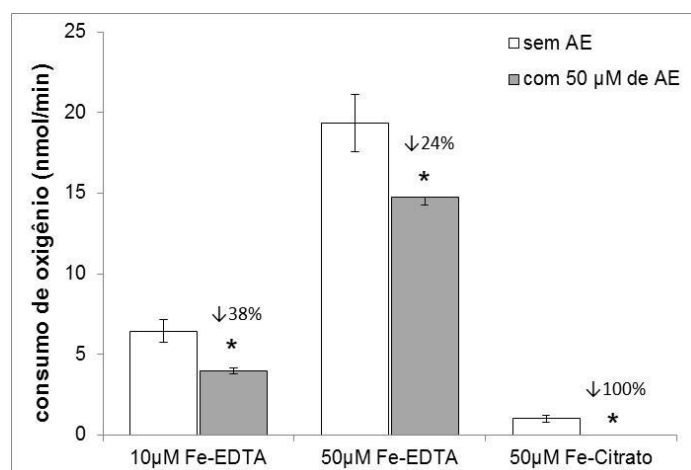


Figura 10: Velocidade de consumo de oxigênio obtido na presença de Fe^{3+} -EDTA ou Fe^{3+} -citrato (razão 1:1). Efeito da pré-incubação de 50 μM de AE com o Fe^{3+} -ligante na cinética de consumo de oxigênio. Ensaio experimental realizado em meio contendo 20 mM de tampão KPi (pH 7,2), 10 ou 50 μM de Fe^{3+} -ligante (razão 1:1) e 0,1 mM de ascorbato.

A cinética de consumo de oxigênio é dependente do tipo ligante utilizado no ensaio e da concentração de Fe^{3+} -ligante (razão 1:1). Ensaio realizado com EDTA apresenta uma taxa de consumo de oxigênio quase 20 vezes maior do que a obtida com citrato na mesma concentração de Fe^{3+} (50 μM) e ascorbato (0,1 mM) e mantém-se mais alto do que o citrato mesmo quando a concentração de Fe^{3+} -EDTA diminui para 10 μM (figura 10). A diminuição de Fe^{3+} -EDTA de 50 μM para 10 μM diminui significativamente a cinética de consumo de oxigênio e passa a ser um terço da velocidade observada com 50 μM . A adição de 50 μM de AE promove diminuição significativa da cinética em todas as condições experimentais analisadas, porém, o percentual da queda de velocidade oferecido pelo AE não é igual para todas as condições. A presença de AE inibe completamente o consumo de oxigênio no ensaio experimental contendo citrato, porém, diminui apenas 38% e 24% a taxa de consumo de oxigênio nos ensaios contendo respectivamente 10 e 50 μM de Fe^{3+} -EDTA (razão 1:1). O resultado de cinética de consumo de oxigênio está de acordo com a cinética de dano oxidativo realizado com citrato e EDTA (figura 8). O resultado de cinética de consumo de oxigênio demonstra novamente que o AE apresenta maior eficiência na presença de um ligante mais fraco como o citrato. Além disso, assim como foi observado no ensaio da variação do tempo de pré-incubação de AE com Fe^{3+} -EDTA (figura 6), observa-se que o AE apresenta melhor efeito na diminuição da taxa de consumo de oxigênio quando encontra-se presente em maior concentração que o Fe^{3+} -EDTA.

4.3.5 - Análise da cinética de formação do complexo ferro-AE na presença de diferentes ligantes de ferro.

A cinética de formação do complexo ferro-AE na presença dos ligantes citrato e EDTA também foi analisada (figura 11). O ensaio foi realizado em meio tamponado (tampão fosfato, pH 7,2) na mesma concentração de ferro e AE, ambos 20 μM , e os resultados foram comparados com um ensaio realizado sem ligante de ferro (figura 11 – painel C).

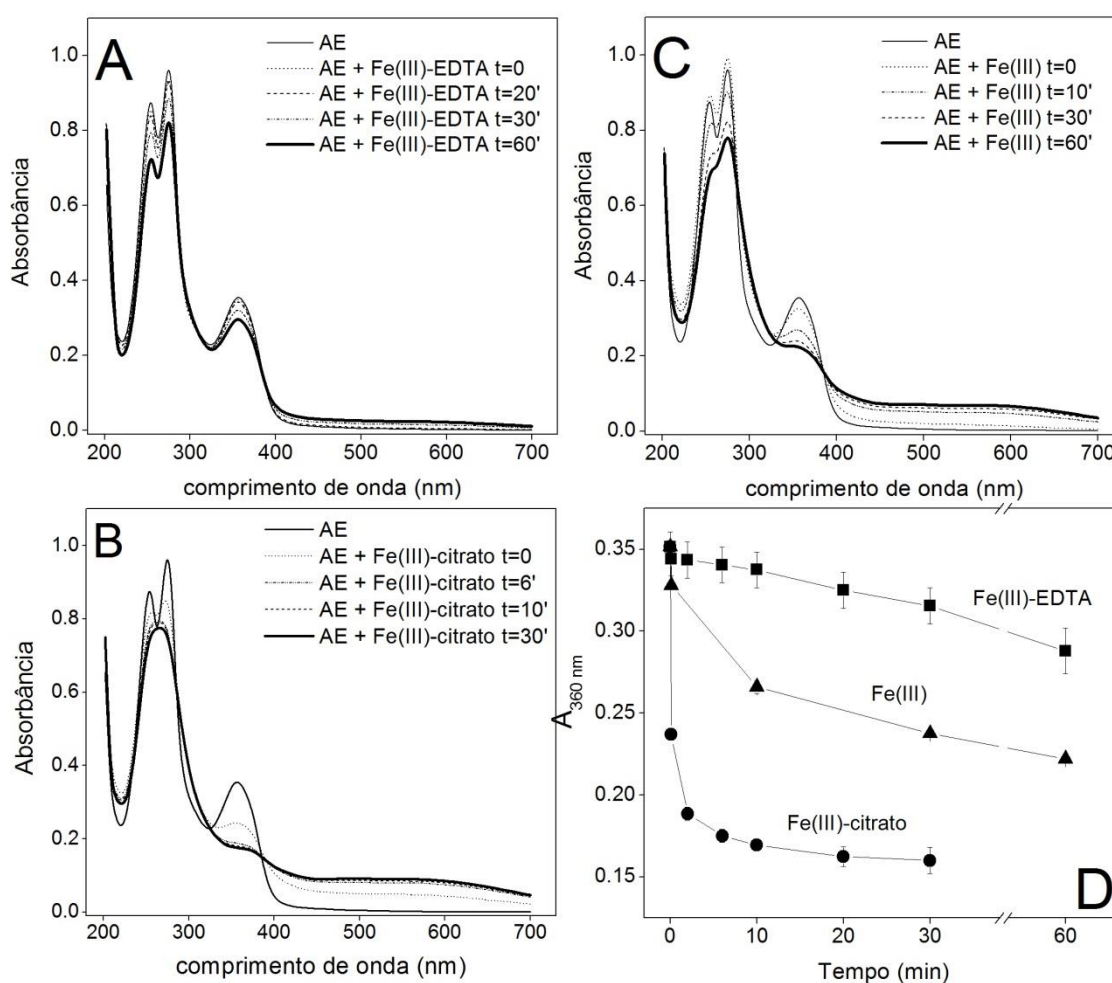


Figura 11: Cinética de formação do complexo ferro-AE realizado na ausência (**Painel C**) ou na presença de diferentes ligantes (EDTA – **Painel A**; Citrato – **Painel B**). Meio reacional contendo 20 mM de KPi (pH7,2), 20 μM de AE e 20 μM de Fe^{3+} ou Fe^{3+} -ligante (razão 1:1). **Painel D** corresponde à cinética de formação do complexo ferro-AE na ausência ou na presença de ligantes de ferro obtida por meio do decaimento da absorbância em 360 nm (dado obtido dos painéis A, B e C).

A formação do complexo Fe^{3+} -AE é observada pela diminuição do pico de absorção do AE em 360nm e aumento da absorbância por volta de 400-600 nm. No ensaio realizado com citrato, o AE desloca rapidamente o ferro do complexo Fe^{3+} -citrato e, em aproximadamente 1 minuto, todo AE se encontra complexado com o ferro. Por outro lado, durante o período de 1 hora, verificou-se que o AE desloca o ferro do complexo Fe^{3+} -EDTA de forma lenta e linear, o que corrobora com os resultados obtidos por Ginani, os quais verificaram que o AE apresenta dificuldade de complexar o ferro na presença do EDTA (Ginani, 2005). Cinética intermediária foi observada na ausência de ligante de ferro; nessa condição o Fe^{3+} pode estar precipitado (devido ao pH neutro) ou formar complexo com o fosfato do tampão (Reinke et al., 1995), o que dificultaria a formação do complexo ferro-AE.

4.4 – Discussão e conclusão

Os resultados apresentados mostram que o AE possui efeito antioxidante por meio do mecanismo quelante de íons férricos. A complexação do ferro pelo o AE impede o dano oxidativo a biomoléculas como a 2-DR. O estudo do potencial antioxidante do AE no sistema contendo EDTA mostra que o AE é eficiente quando está presente no meio em concentrações maiores do que o complexo Fe^{3+} -EDTA. Além disso, a incubação prévia do AE junto com o complexo Fe^{3+} -EDTA aumenta a eficiência antioxidante do AE, uma vez que permite que parte do Fe^{3+} seja removido do EDTA e se complexe com o polifenol antes do início das reações radicalares.

De acordo com o conjunto de resultados apresentados por Ginani em sua dissertação de mestrado, o deslocamento de parte do ferro ligado ao EDTA pelo AE leva a uma diminuição na produção de radical ascorbil. A presença de 50 μM de AE diminui 22% da intensidade do sinal do radical ascorbil analisado por EPR (sigla em inglês do equipamento de Ressonância Paramagnética Eletrônica) o que demonstra que o mecanismo quelante do AE age logo na primeira etapa da reação que é necessária para a produção de radical hidroxil (Ginani, 2005 – figura 12). O estudo de Ginani não analisou o efeito do AE na presença de outros ligantes, como por exemplo citrato e NTA. Segundo o conjunto de resultados apresentado com o citrato acredita-se que em meio contendo Fe-citrato, o AE seja capaz de inibir totalmente a formação de ascorbil, uma vez que inibiu completamente o consumo de oxigênio que corresponde à reação seguinte à formação de radical ascorbil.

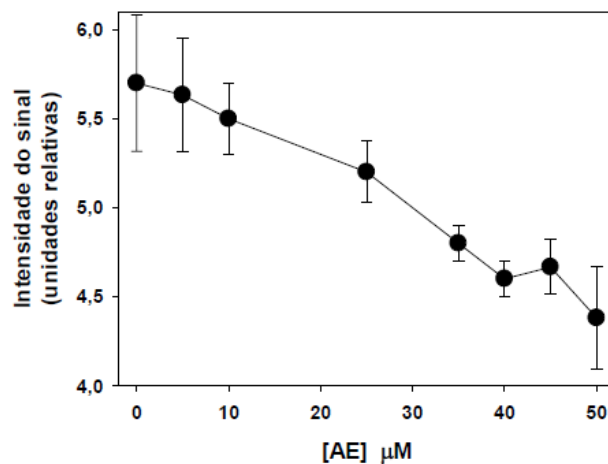


Figura 12: Retirado de Ginani 2005: Efeito da concentração de AE na produção de radical ascorbil mediada por 10 μM de Fe³⁺-EDTA (razão 1:1) e 0,5 mM de ascorbato. Fe³⁺-EDTA e AE foram pré-incubados por 30 minutos antes do início da reação iniciada pela adição de ascorbato.

A formação do complexo ferro-AE é fundamental para que ocorra proteção do AE. Os resultados indicam que o AE impede de forma eficiente que o ferro participe das reações redox que levam a produção de radical hidroxil. O resultado de inibição do consumo de oxigênio na presença de citrato comprova que o AE indisponibiliza o ferro do meio reacional. Estudos mostram que os complexos de AE com íons metálicos são instáveis e precipitam rapidamente dependendo do pH do meio. Segundo estudo de Przewloka & Shearer, a precipitação do complexo ferro-AE (Fe²⁺ ou Fe³⁺) é desfavorável em pH 1 (variando de 3 a 5% da concentração inicial de ferro adicionado no meio), mas atinge seu maior percentual de precipitação em pH 7, onde aproximadamente 98% do ferro encontra-se precipitado após incubação *over night* com o AE (Przewloka e Shearer, 2002). Além disso, Bock e colaboradores verificaram que a ativação da coagulação sanguínea pelo AE se deve à formação de agregados insolúveis de AE com íons metálicos. Mais ainda, a formação desses agregados era prevenida pela adição de 1 mM de EDTA no meio (Bock, et al., 1981).

Além disso, Ginani também demonstrou que ao se ligar com o Fe³⁺, o AE promove a redução do íon férrico levando a formação de um complexo Fe²⁺-AE_(semiquinona) (Ginani, 2005). A redução do Fe³⁺ pelo AE foi comprovada por meio do ensaio da ferrozina, um ligante exclusivo de Fe²⁺ (figura 13). A ligação da ferrozina com o Fe²⁺ leva à formação de um complexo violeta de λ_{máx} em 562 nm. Esse resultado indica que o mecanismo

antioxidante do AE não se restringe apenas a remoção do íon metálico do meio reacional, mas também afeta a reação de Fenton (quarta reação) que leva a produção de radical hidroxil (vide esquema abaixo). A reação de Fenton se caracteriza pela presença importante do ferro em sua forma reduzida. A capacidade de polifenóis em reduzir o Fe^{3+} pode oferecer tanto uma atividade antioxidante quanto pro-oxidante uma vez que oferece íons ferrosos necessários para reação de Fenton. Entretanto, no mesmo estudo, Ginani mostra que o AE também é capaz de inibir o dano oxidativo em sistema contendo reagentes de Fenton (Fe^{2+} e H_2O_2 – vide figura 5 da introdução desse capítulo) (Ginani, 2005).

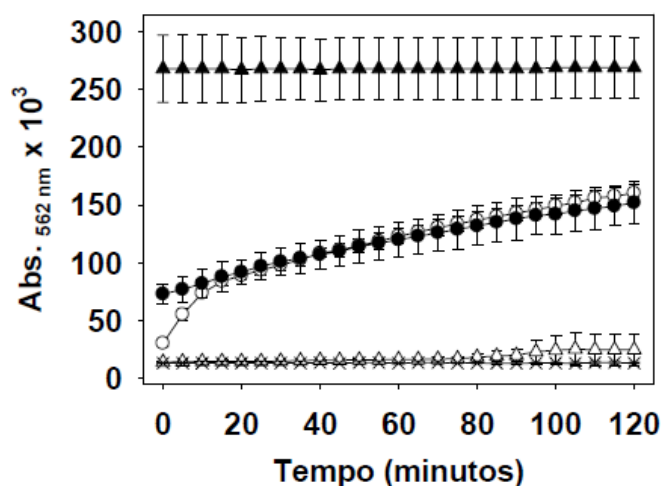
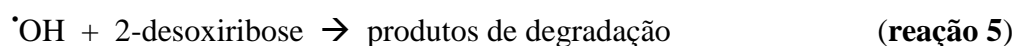
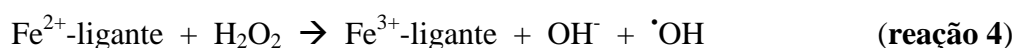
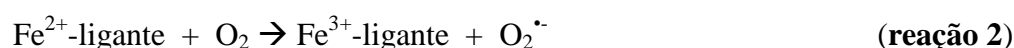
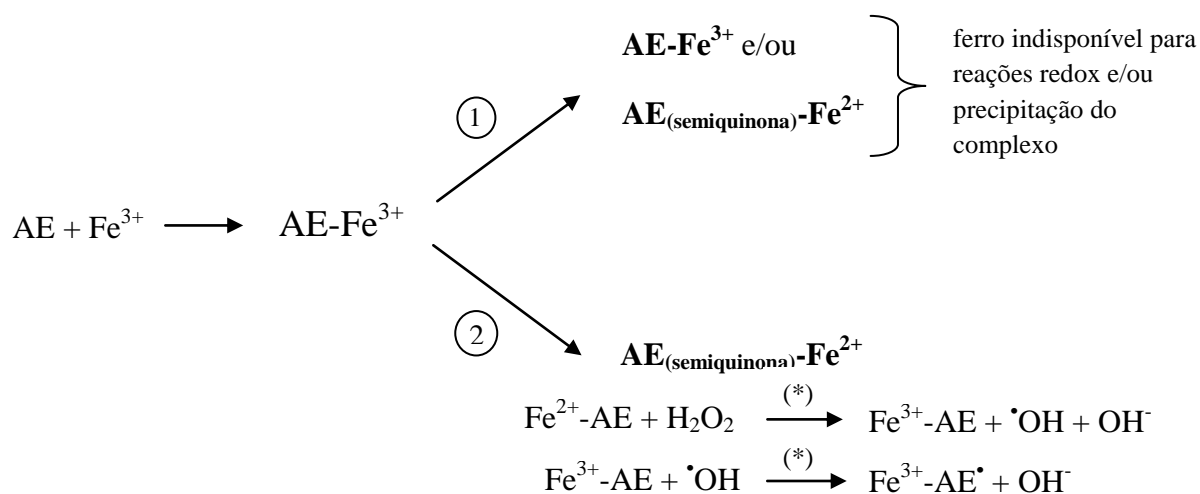


Figura 13: Retirado de Ginani 2005. Cinética de formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina na presença de AE e Fe^{3+} . Condição experimental: 20 mM de tampão Kpi (pH 7,2), 10 μM de Fe^{3+} , 50 μM de AE e 10 mM de ferrozina. (○) corresponde ao ensaio realizado sem pré-incubação do AE com Fe^{3+} . (●) corresponde ao ensaio realizado com incubação prévia do AE com Fe^{3+} por 1 hora antes da adição de ferrozina. (▲) ensaio realizado na presença de Fe^{2+} e ferrozina ou (△) Fe^{3+} e ferrozina ou (×) ferrozina livre.

Apesar do AE ser capaz de ligar tanto a Fe^{2+} quanto a Fe^{3+} , estudos mostram que polifenóis formam complexos mais estáveis com Fe^{3+} do que com Fe^{2+} (Perron e Brumaghim, 2009). A formação de complexos de Fe^{2+} com catecolatos (como o do AE) aumenta a taxa de oxidação do ferro e reduz sua taxa de redução (Perron e Brumaghim, 2009). O aumento da taxa de oxidação na presença de AE parece, a princípio, contradizer os resultados apresentados nesse estudo. Porém, acredita-se que o H_2O_2 (produzido a partir da autooxidação do ferro não ligado ao AE) reagiria rapidamente com o complexo Fe^{2+} -AE produzindo radical hidroxil, porém este último seria sequestrado diretamente pelo complexo ferro-AE, impedindo dessa forma a oxidação da 2-DR ou demais biomoléculas (vide esquema 3 – hipótese 2). Essa proposta foi apresentada em 2006 por nosso grupo de pesquisa no estudo do mecanismo antioxidante quelante do polifenol AT em sistema gerador de radical hidroxil mediado por Fe^{3+} e ascorbato (Andrade et al., 2006).



Esquema 3: Hipóteses do mecanismo de proteção do AE em sistema gerador de radical hidroxil mediado por Fe^{3+} e ascorbato. A ligação do AE com íons Fe^{3+} promove: **Hipótese 1:** precipitação do complexo ferro-AE e indisponibilização do metal para as reações que levam a produção de radical hidroxil; **Hipótese 2:** redução do ferro e formação do complexo Fe^{2+} -AE. A presença de íons ferrosos complexados com o AE favoreceria a oxidação do ferro pelo H_2O_2 , porém o hidroxil formado nessa reação reagiria diretamente no complexo ferro-AE, impedindo a oxidação de biomoléculas. (*) reações favorecidas pela formação do complexo ferro-AE.

Os resultados obtidos com o uso de ligantes com menor afinidade por Fe^{3+} demonstram que a cinética de formação do complexo AE-ferro é relativamente rápida e eficiente e está diretamente relacionada com a diminuição dos danos oxidativos a 2-DR. Em particular, o resultado obtido com o ligante citrato indica que o AE é capaz de formar complexo com o ferro na razão 1:1 (ferro-AE). Resultados obtidos em sistemas contendo Cu^{2+} e ascorbato também mostraram formação de complexo cobre-AE na razão 1:1, o que reforça a boa capacidade do AE em formar complexos com íons metálicos (Dalvi, 2008). A formação do complexo nessa razão demonstra que para apresentar máxima proteção basta que o AE esteja presente no meio reacional na mesma concentração do ferro-citrato. Além disso, observa-se em nosso estudo que a cinética de dano à 2-DR é mais lenta na presença de citrato e NTA quando comparado com a reação realizada com EDTA (vide figura 8). Outros estudos também observaram que a cinética de reação na presença de citrato é mais lenta do que a obtida com o ligante EDTA (Welch et al., 2002; Halliwell, 1978). A constante de oxidação do Fe^{2+} pelo oxigênio na presença de EDTA, por exemplo, corresponde a $k > 11,5 \text{ s}^{-1}$ enquanto que com citrato essa constante diminui para $7,2 \text{ s}^{-1}$ (taxa adquirida com $110 \mu\text{M}$ de Fe^{2+} e $550 \mu\text{M}$ do ligante) (Welch et al., 2002). A cinética de reação mais lenta na presença de citrato permite que o AE remova os íons férricos do citrato antes que este reaja com os demais substratos presentes no meio, favorecendo ainda mais o potencial antioxidante do AE.

O citrato é um dos principais compostos de baixo peso molecular capaz de ligar o ferro quelável intracelular. Além do citrato, outros componentes de baixo peso molecular, como o fosfato e o ATP, também ligam ferro de forma transitória (Petrat et al., 2000; Petrat et al., 2001). No entanto, a formação desses complexos não impede a participação do ferro em reações geradoras de EROs, o que torna importante o estudo de novos quelantes com ação antioxidante para prevenir os danos provocados pelo ferro.

A eficiente capacidade quelante *in vitro* do AE na presença de citrato torna-o elegível para estudos em célula. Apesar da boa eficiência em quelar íons metálicos *in vitro*, ainda não se sabe ao certo se o AE teria o mesmo comportamento quelante *in vivo*. O mecanismo antioxidante do tipo quelante do AE depende não apenas da sua concentração ou da concentração de ferro quelável na célula, mas também da localização intracelular destes compostos. É importante salientar que moléculas quelantes apresentam efeito protetor mesmo em pequenas concentrações (Lopes et al., 1999). Por outro lado, moléculas sequestradoras de radicais livres tais como ascorbato, tocoferol e urato apresentam efeito antioxidante na faixa milimolar (Lotito & Frei, 2006; Lopes et al., 1999). Portanto, baixas concentrações de AE

poderiam ter efeito protetor na célula, uma vez que a concentração de ferro quelável na célula também é baixa, na faixa de 10^{-6} a 10^{-7} M (Petrat et al., 2000; Petrat et al., 2001).

O acúmulo de ferro em determinados tecidos foi observado em diversas doenças tais como Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doenças hepáticas e coronarianas, câncer, diabetes e no processo de envelhecimento. Apesar da causa do acúmulo de ferro ainda ser desconhecida, a presença de ferro nestes tecidos está relacionada com o aumento na produção de espécies reativas, o que pode explicar em parte o desenvolvimento e progressão da doença (Moreira et al., 2008; Stocker & Keaney, 2004; Drechsel & Patel, 2008). Neste sentido, a administração de moléculas quelantes com capacidade antioxidante poderia ajudar no tratamento e no prognóstico de tais doenças.

5 - Capítulo 2: Estudo da atividade antioxidante do ácido elágico em *S. cerevisiae* selvagem e deficiente em SOD1.

5.1 - Introdução

O ácido elágico (AE) é um polifenol presente em alimentos de origem vegetal tais como romã, frutas vermelhas (amora, morango, framboesa), uva e nozes (Daniel et al., 1989). Estudo *in vitro* a respeito da capacidade antioxidante mostra que o AE é capaz de seqüestrar espécies reativas de oxigênio (radical hidroxil – OH[•]), de nitrogênio (dióxido de nitrogênio – [•]NO₂, peroxinitrito – ONOO⁻) e radical peroxil - LOO[•] (Priyadarsini et al., 2002). Além disso, o AE complexa íons metálicos tais como Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺ (Bock et al., 1981; Jaén et al., 2003; Przewloka & Shearer, 2002). A capacidade quelante do AE indisponibiliza os íons metálicos para reações redox produtoras de EROs, diminuindo, dessa forma, o dano oxidativo à biomoléculas (Ginani, 2005; Dalvi, 2008).

Estudos *in vivo* e em cultura de células indicam que o AE possui outros efeitos benéficos que não se limitam apenas a uma ação antioxidante direta. O ácido elágico possui efeito anticarcinogênico e antimutagênico contra uma variedade de carcinógenos, incluindo nitrosaminas, micotoxinas, aminas aromáticas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros (Ahn et al., 1996; Szafer et al., 2003; Ayrton et al., 1992; Khanduja et al., 1999). A maior parte das substâncias potencialmente carcinogênicas requer ativação metabólica, processo que ocorre durante o metabolismo de xenobióticos. Durante o processo de ativação, os xenobióticos sofrem modificações por enzimas de fase I e de fase II antes de serem excretados (Xu et al., 2005). As enzimas de fase I são constituídas primariamente pela família da citocromo P450 (CYP) e são responsáveis pela bioativação do carcinógeno (Xu et al., 2005). O aumento da expressão de CYP geralmente está relacionado com o desenvolvimento de câncer (Moon et al., 2006). As enzimas de fase II metabolizam ou promovem a conjugação do xenobiótico à diversas biomoléculas, aumentando sua hidrofiliabilidade, o que por sua vez melhora sua excreção pela bile e/ou urina (Xu et al., 2005). As enzimas de fase II incluem UDP-glucuronosiltransferases (UGT), NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO), glutathione-S-transferase (GST), dentre outras. Estudos verificaram que o efeito protetor do AE contra carcinógenos está relacionado com: **i)** a inibição de enzimas da família do citocromo P450; **ii)** a indução das enzimas de fase II, em especial GST, NQO e UGT, e demais enzimas antioxidantes; **iii)** a interação direta do polifenol com os intermediários

reativos formando adutos inativos (Ayrton et al., 1992; Szaefer et al., 2003; Barch et al., 1994; Barch et al., 1996; Ahn et al., 1996; Smith et al., 1998).

O uso de modelos celular ajuda a compreender melhor como os polifenóis agem na célula. Em especial, modelos experimentais com levedura apresentam vantagens metodológicas uma vez que corresponde a uma célula eucariótica com sistema celular semelhante ao humano, apresenta um genoma conhecido e é possível inserir ou deletar genes do seu genoma. Leveduras da espécie *S. cerevisiae* deficientes em superóxido dismutase 1 e 2 (SOD1 e SOD2) são viáveis, porém apresentam uma série de comprometimento metabólico. Estudos mostram que as linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em SOD1 e/ou SOD2 (Δ sod1, Δ sod2 e Δ sod1 Δ sod2) são mais susceptíveis ao estresse em condições aeróbicas devido a sua ineficiência em eliminar prontamente o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O aumento de $O_2^{\cdot-}$ na célula promove à degradação do grupamento Fe-S presente em algumas enzimas relacionadas ao metabolismo energético (aconitase) e de aminoácidos (homoaconitase e isopropilmalato desidratase) (Wallace et al., 2004). O ataque do $O_2^{\cdot-}$ aos grupamentos Fe-S promove a liberação do ferro da estrutura da enzima, promovendo, conseqüentemente, sua inativação (maiores detalhes no tópico 2.4.1 da revisão bibliográfica) (Srinivasan et al., 2000; De Freitas et al., 2000). O aumento de ferro livre pode mediar reações geradoras de EROs, em especial radical hidroxil ($\cdot OH$), promovendo um dano oxidativo ainda mais severo. Devido a degradação do grupamento Fe-S das enzimas, leveduras deficientes em SOD apresentam maior demanda por ferro para reconstrução do grupo prostético (De Freitas et al., 2000). A inativação de enzimas chaves do metabolismo energético e do metabolismo de aminoácidos promovida pelo $O_2^{\cdot-}$ faz com que células deficientes em SOD, em especial SOD1, apresentem baixa taxa de crescimento aeróbico, principalmente em substratos não-fermentáveis, auxotrofia por lisina e metionina e rápida perda de viabilidade em fase estacionária. Além disso, linhagens de levedura deficientes em SOD são altamente susceptíveis ao estresse na presença de drogas que sofrem ciclo redox, como a menadiona, uma vez que sua metabolização dentro da célula leva a produção de EROs, em especial radical $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (Gralla e Valentine, 1991).

Tendo em vista as características químicas e biológicas do AE relatadas em diversos estudos, o presente trabalho objetivou verificar o efeito do AE em leveduras selvagem e deficiente na enzima superóxido dismutase 1 (SOD1) submetidas ao estresse com menadiona. Acredita-se que o AE poderia promover efeito protetor em leveduras deficientes em SOD, tanto por possuir capacidade quelante de ferro quanto por modular a expressão de enzimas de

fase II e de enzimas antioxidantes. O efeito do AE foi comparado com a desferroxamina (DFO), um quelante clássico de ferro produzido por bactérias que é naturalmente internalizado pela levedura como forma de otimizar sua captação de ferro do meio. O uso desse quelante de ferro permite avaliar o papel do ferro no estresse induzido pela menadiona.

5.2 – Materiais e métodos:

5.2.1 - Linhagens de *S. cerevisiae* e condições de crescimento:

As linhagens de *S. cerevisiae* EG 103 (selvagem – Mata, leu2 his3 trp1 ura3), EG 110 (EG103 com Δ sod2::TRP1), EG 118 (EG103 com Δ sod1::URA3) e EG 133 (EG 103 com Δ sod1::URA3 e Δ sod2::TRP1) foram utilizadas no presente estudo. As linhagens foram gentilmente cedidas pela professora Dr. Edith Butler Gralla (Universidade da Califórnia, UCLA, Los Angeles) e mantidas a -80°C em glicerol 30%. Uma amostra de cada linhagem foi mantida em geladeira (4°C) em meio YPD ágar (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar). As células cresceram em meio sintético YNB (DIFCO) com 2% de glicose enriquecido 4 vezes com os aminoácidos leucina (400 mg/mL), histidina (80 mg/mL), triptofano (80 mg/mL), metionina (80 mg/mL) e as bases nitrogenadas uracila e adenina (ambas 80 mg/mL) (De Freitas et al., 2000). As células foram inoculadas em erlenmeyer estéril a uma razão 5:1 (volume do frasco/volume do meio) e incubadas em shaker a 200 rpm e a 28°C. O crescimento foi acompanhado pela leitura da densidade óptica a 600 nm (OD). A concentração de células foi quantificada em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico.

5.2.2 - Curva de crescimento das linhagens selvagem e deficientes em SOD.

A curva de crescimento permite determinar as fases de crescimento da levedura, uma vez que cada linhagem apresenta uma curva de crescimento própria que é dependente da fonte de carbono (fermentável ou não fermentável) e sua concentração, da quantidade de oxigênio no meio, da temperatura de crescimento, entre outros.

As curvas de crescimento foram realizadas em condição de normóxia e com fonte de carbono fermentável (glicose 2%) segundo as condições de crescimento descritas na parte de

materiais e métodos (tópico 5.2.1). De acordo com as características de crescimento de cada linhagem, observa-se que as linhagens selvagem e $\Delta sod2$ apresentam a mesma taxa de crescimento (figura 14). A linhagem $\Delta sod1$ apresenta crescimento mais lento do que as duas linhagens anteriores e atinge uma menor densidade de células em fase estacionária. O maior atraso no crescimento é observado na linhagem $\Delta sod1\Delta sod2$, cuja fase lag de crescimento mostra-se mais extensa (Figura 14).

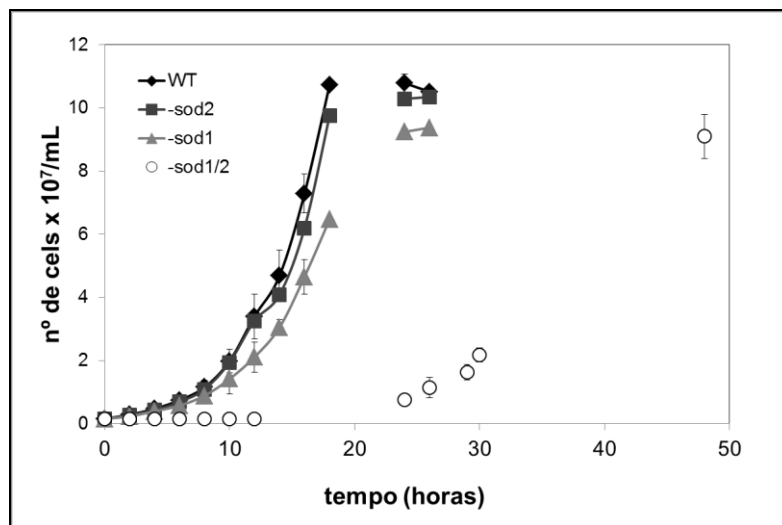


Figura 14: Curva de crescimento das linhagens selvagem, $\Delta sod1$, $\Delta sod2$ e $\Delta sod1\Delta sod2$ de *S. cerevisiae*. Crescimento em meio sintético YNB com 2% de glicose, em frascos com razão 5:1 (volume/meio) e incubação em shaker a 200 rpm e 28°C. Resultados representam as médias \pm desvio padrão (n=3).

Segundo a literatura, leveduras em fase estacionária são mais resistentes ao estresse oxidativo quando comparadas às células em fase exponencial (Toledano et al. 2003; Werner-Washburn et al. 1993). Portanto, optou-se por trabalhar com leveduras em fase exponencial que supostamente estariam mais susceptíveis a danos oxidativos. Um teste piloto realizado com a levedura selvagem revelou que a levedura de início de fase exponencial ($1,5 \times 10^7$ cel/mL) apresenta maior sensibilidade ao estresse com menadiona quando comparado com a levedura coletada no meio da fase exponencial de crescimento ($4,5 \times 10^7$ cel/mL) (figura 15).

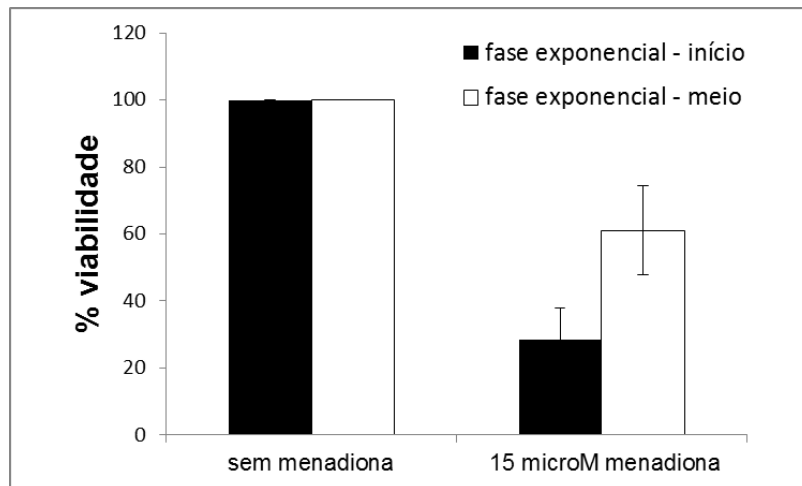


Figura 15: Efeito da fase de crescimento (início ou meio da fase exponencial) na sensibilidade da levedura selvagem ao estresse com 15 μM de menadiona. Células em início de fase exponencial ($1,5 \times 10^7$ cel/mL) ou no meio da fase ($4,5 \times 10^7$ cel/mL) foram coletadas e ressuspensas em PBS. As células foram submetidas ou não ao estresse com 15 μM de menadiona e incubadas em shaker por 2h a 200 rpm e 28°C. Após o insulto, as células foram plaqueadas em meio YPD-ágar e as colônias formadas foram contadas após incubação de 2-3 dias a 28°C.

5.2.3 - Determinação da concentração de menadiona a ser utilizada nos ensaios.

As leveduras foram inoculadas em meio YNB a uma concentração inicial de aproximadamente 3×10^5 cel/mL em erlenmeyer estéril com razão 5:1 (volume do frasco/volume do meio) e mantidas sob agitação a 200 rpm e 28°C. Após atingir o crescimento de início de fase exponencial (concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ cel/mL), as células foram coletadas por centrifugação ($5000 \times g/5$ min/4°C), lavadas 3 vezes com PBS e ressuspensas para mesma concentração final em PBS. O ensaio de sensibilidade à menadiona foi realizado em microplaca estéril de 96 poços. Adicionou-se 99 μL da suspensão de células em cada poço da microplaca seguida de 1 μL de solução de menadiona (SIGMA) contendo concentrações crescentes da droga. Após a adição da menadiona, as células foram incubadas em shaker a 28°C e 200 rpm por 2 horas. Em seguida, as amostras foram diluídas em PBS, nas razões de 1:10; 1:10²; 1:10³ e 1:10⁴, plaquenadas com adição de 5 μL de cada diluição em meio YPD ágar e incubadas por 2-3 dias a 28°-30°C. Por ser preparada em etanol, a menadiona foi adicionada ao meio na proporção de 1% do volume final. Um controle feito com 1% de etanol foi realizado para verificar a viabilidade celular na presença apenas do solvente.

5.2.4 - Ensaio experimental.

Leveduras selvagem (EG 103) e deficiente em SOD1 (EG 118) em início de fase exponencial (concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ cel/mL) foram coletadas e lavadas 3 vezes em PBS 1X. As células foram então ressuspendidas (mantendo-se a concentração celular constante) em 15 mL (volume final) de PBS 1X contendo 0, 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M de AE ou 50 μ M de desferroxamina (DFO). As células foram incubadas a 28°C por 5 horas sob agitação a 200 rpm e, em seguida, adicionou-se menadiona (1% v/v) de modo que sua concentração final fosse de 5 ou 15 μ M. Adicionou-se então etanol (1% v/v) nos grupos experimentais não tratados com menadiona (situação controle). As células foram novamente incubadas por mais 2 horas em shaker (200 rpm e 28°C). Após tratamento com menadiona, retirou-se uma alíquota para análise da viabilidade celular e o restante das células foram coletadas, lavadas com PBS 1X, pesadas e congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores. Todos os ensaios foram realizados em tubos estéreis com tampa de rosca de 24 x 200mm.

5.2.5 - Viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada por meio da quantificação de colônias formadas após plaqueamento em meio YPD ágar. Uma alíquota do ensaio experimental foi diluída 400 vezes e 30 μ L da suspensão diluída foi plaqueada em meio YPD ágar e mantida a 28°C por 3 dias em estufa bacteriológica. Os dados de viabilidade foram expressos em percentual de colônias formadas, tendo como referência o controle sem AE e menadiona de cada linhagem.

5.2.6 - Concentração de glutathiona total e reduzida.

A concentração de glutathiona total foi obtida de acordo com o protocolo de Welker (2009). A concentração de glutathiona total é determinada pela reação de duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) com uma molécula de 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) que forma como produto 2 moléculas de 5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB), de coloração amarelada com pico absorção em 412 nm, e uma molécula de glutathiona oxidada (GSSG).

Como demais aminoácidos contendo sulfidrilas também são capazes de reduzir o DTNB formando TNB, o ensaio experimental foi realizado com a adição da enzima específica para a glutationa, a glutationa redutase (GR), junto com seu substrato redutor, o NADPH.

A concentração de glutationa total foi expressa em equivalente de glutationa (eq-GSH). O ensaio experimental foi realizado em cubeta de plástico, 1 mL de volume final, em meio tamponado (tampão fosfato, pH 7,0) contendo 0,1 mM de NADPH, 0,1 mM de DTNB e 0,05 U/mL de GR. A presença de GR permite que a GSSG seja reduzida e quantificada no ensaio, fazendo parte portanto do conteúdo de glutationa total das amostras. A reação foi iniciada pela adição de GR e a concentração de glutationa foi determinada pela taxa de formação de TNB analisada em 412 nm.

A quantificação de GSSG foi permitida por meio da incubação prévia dos homogenatos com 2-vinilpiridina, que indisponibiliza a GSH para reação (Griffith, 1980). Como a concentração de GSSG na célula é menor do que a concentração de eq-GSH, utiliza-se maior concentração GR (aproximadamente 0,3 U/mL) para oferecer maior sensibilidade no teste de GSSG.

As taxas de formação de TNB foram comparadas às taxas obtidas para construção da curva padrão utilizando concentrações crescentes de GSH. As curvas foram preparadas nos dias do ensaio, antes das análises das amostras.

A) Preparo das amostras para quantificação de eq-GSH e GSSG

As células congeladas foram mantidas em gelo e homogeneizadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL com ácido tricloroacético (TCA) 10% (concentração final), diluição 1:10, com o auxílio de pérolas de vidro de aproximadamente 500 microns (quantidade 5x maior que o peso das amostras). Foram realizados 20 ciclos de 1 minuto no vórtex seguido de 1 minuto no gelo para favorecer o rompimento da estrutura celular da levedura. Os homogenados foram centrifugados por 6 minutos, a 10.000xg e a 4°C.

Foram separados dois tubos por amostra para medir eq-GSH e GSSG. No tubo destinado para medir eq-GSH foi adicionado 100 µL do sobrenadante ácido do homogenato, seguido de 300 µL de tampão fosfato 0,5M (pH 7,0) e 20 µL de etanol. No tubo destinado para medir GSSG seguiu-se o mesmo procedimento, porém, o etanol foi substituído por 20

μL de VP 0,5M em etanol. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e mantidos por mais de 1 hora no escuro em temperatura ambiente antes das análises.

O resultado de eq-GSH e GSSG de todas as amostras foram analisados usando-se como referência o controle sem AE e sem menadiona de cada linhagem.

5.2.7 - Permeabilidade de membrana analisada por citometria de fluxo

O ensaio de permeabilidade de membrana permite avaliar se o tratamento com menadiona foi capaz de alterar a fluidez da membrana citoplasmática das leveduras selvagem e Δod1 . A peroxidação dos lipídios de membrana pode levar ao aumento da fluidez de membrana ou até mesmo ao rompimento da bicamada lipídica o que impossibilitaria a viabilidade celular (Halliwell & Gutteridge, 2007). A integridade da membrana indica que a célula pode potencialmente manter sua atividade metabólica uma vez que não possui perdas de gradiente no seu interior. Porém, mesmo as células que possuem a membrana íntegra podem apresentar comprometimento na sua capacidade de se dividir formando novas colônias (Díaz et al., 2010; Oliver, 2005).

A permeabilidade de membrana foi analisada por citometria de fluxo. O corante fluorescente, iodeto de propídio (IP), foi utilizado como marcador de células com alteração de permeabilidade de membrana. Células de bactéria e de eucariotos são impermeáveis ao IP. Porém, alterações da permeabilidade (integridade) da membrana faz com que o corante entre na célula e se ligue a ácidos nucleicos, tornando a célula fluorescente (Veal et al., 2000).

A concentração de IP utilizada nas amostras foi determinada por teste preliminar realizado com diferentes concentrações de IP. Leveduras em fase exponencial de crescimento foram coletadas e ressuspensas em PBS a uma concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ cel/mL. A amostra de levedura foi distribuída em dois frascos. Um dos frascos de amostra foi colocado em banho-maria a 100°C por 30 minutos para promover a morte celular. O outro frasco foi mantido em gelo. Em seguida, as amostras de células mortas e vivas foram misturadas na proporção 1:1. A solução estoque de IP (5 mg/mL) foi submetida à diluição seriada. Adicionou-se 40 μL de cada concentração de IP em 960 μL da mistura de células. Um controle negativo sem IP foi utilizado para determinar a fluorescência basal das células. As amostras foram mantidas no gelo, sob abrigo da luz, por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura das amostras no citômetro de fluxo (FacsCalibur - BD). As amostras foram

analisadas no detector de fluorescência FL2 nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 585 nm respectivamente. Cada análise foi realizada com 50 mil células (eventos) utilizando o software *CellQuest Pro*.

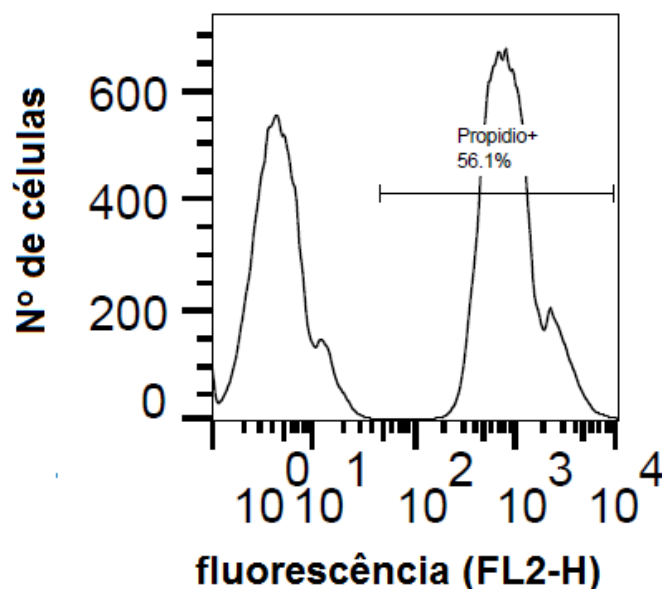


Figura 16: Amostra de levedura preparado com 50% de células vivas e 50% de células mortas marcadas com 50 µg/mL de IP.

A concentração final de 50 µg/mL de IP foi escolhida para análise de permeabilidade de membrana das amostras experimentais (a figura 16 corresponde ao resultado do teste obtido para esta concentração). Após ensaio experimental, as células foram coletadas, lavadas e ressuspensas em PBS para a mesma concentração de células. Em seguida, as células foram incubadas com solução de IP (concentração final de 50 µg/mL) segundo protocolo descrito anteriormente. Um controle sem IP e outro contendo somente células mortas (células submetidas a 100°C por 30 minutos) foram preparados no dia do ensaio para calibrar o equipamento.

5.2.8 – Medida da concentração de ergosterol e peróxidos lipídicos por HPLC.

As amostras de células congeladas foram desidratadas em *speed vac* por 1 hora a 30°C e os pesos secos foram registrados. As amostras foram transferidas para tubos de ensaio com

rosca e ressuspensas com 200 µL de água milli-q com o auxílio do vórtex. Após adição de 325 µL de clorofórmio contendo 1 mM de BHT e 325 µL de metanol, as amostras foram homogeneizadas vigorosamente em vórtex por 30 s. Adicionou-se novamente 250 µL do clorofórmio contendo 1 mM de BHT seguido de 250 µL de NaCl (0,9% m/v). As amostras foram homogeneizadas em vórtex com o auxílio de pérolas de vidro (~500 microns) para auxiliar no rompimento celular. O protocolo de homogeneização foi realizado por meio de 15 ciclos de 1 minuto sob agitação em vórtex seguido de 1 minuto no gelo cada. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g e 4 °C e a fase orgânica inferior foi coletada. Em seguida, mais dois ciclos de extração foram realizados no homogenato com a adição de 1 mL de clorofórmio-BHT (1mM) seguida de homogeneização vigorosa em vórtex, centrifugação e coleta de fase orgânica. O solvente orgânico foi removido das amostras por evaporação com o auxílio de N₂ gasoso (Santos et al., 2012).

Os lipídios extraídos foram ressuspensos em 55 µL de metanol contendo 1 mM de BHT e analisados por HPLC (modelo Nexera da Shimadzu) com a coluna Phenomenex Luna C8 (150 x 4.6 mm). A cromatografia de fase reversa com solução aquosa de metanol foi realizada com volume de injeção de 50 µL, fluxo de 1 mL/min, com o seguinte gradiente de injeção: H₂O (fase A) e MeOH (fase B). 90% B por 10 min; 90-100% B por 1 min; 100% B por 19 min; 100-90% B por 1 min; 90% B por 9 min. A detecção foi realizada no UV a 210 nm (para análise dos derivados oxidados do ergosterol) e 283 nm (pico de absorção do ergosterol) (Bocking et al., 2000).

A) Foto-oxidação do ergosterol.

A foto-oxidação de ergosterol puro foi realizada afim de se identificar os seus produtos de oxidação no HPLC. Os espectros adquiridos dos lipídios extraídos das amostras de leveduras foram comparados com o do ergosterol foto-oxidado. A foto-oxidação foi realizada na presença de azul de metileno como fotossensibilizador. Uma lâmpada de tungstênio (500 W) que emite raios UVA (320-400 nm) foi utilizada sobre o fotossensibilizador gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) no meio. Dentre as EROs destaca-se o oxigênio singlet (¹O₂), o qual promove a oxidação do ergosterol formando diferentes produtos de oxidação (Bocking et al., 2000). A fotossensibilização foi realizada sob agitação em balão de 100 mL de fundo redondo imerso em cuba de gelo e água para prevenir o aquecimento da amostra. Foram adicionados 200 µL de solução de azul de metileno (10 mM preparada em metanol) à solução de 20 mL de ergosterol (10 mg/mL

preparada em clorofórmio). A mistura foi irradiada por 60 minutos e alíquotas de 100 µL foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de foto-oxidação. As alíquotas foram evaporadas sob N₂ gasoso e ressuspensas em 100 µL de metanol. As amostras foram injetadas no HPLC (volume de injeção de 50 µL) seguindo o mesmo protocolo de injeção realizado com os lipídios extraídos das amostras de levedura.

5.2.9 - Atividades enzimáticas

A) Preparo do homogenato:

As células congeladas foram mantidas em gelo e lisadas com o auxílio de pérolas de vidro (~500 microns) (quantidade 5x maior que o peso das amostras) na presença do inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM (preparado em isopropanol e adicionado na concentração final de 0,1 µmol/g de células), tampão fosfato 50 mM (pH 7,2) e EDTA 0,5 mM. As células foram lisadas por meio de 15 ciclos de homogeneização vigorosa com 1 minuto no vórtex seguido de 1 minuto no gelo cada. Os homogenatos foram preparados na diluição de 1:5. Após homogeneização em tubos Eppendorf de 1,5 mL, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000xg e 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para análise das atividades enzimáticas.

B) Atividade Glutationa-S-transferase

A atividade glutathione-S-transferase (GST) foi determinada por meio da taxa de formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno, monitorado pelo aumento da absorvância em 340 nm (Habig & Jakoby, 1981). Segundo esse método, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) é espontaneamente conjugado com a GSH, formando glutathione-2,4-dinitrobenzeno, porém essa reação é catalisada pela enzima GST. Portanto, é necessário fazer um controle do método no qual verifica-se a taxa de formação do conjugado na ausência da enzima (homogenato). O ensaio foi realizado em microplaca (volume final de 200 µL). O meio reacional foi composto por 50 mM de tampão fosfato (pH 7,0), 0,5 mM de EDTA, 1 mM de GSH e 1 mM de CDNB em etanol. O CDNB foi adicionado no meio reacional de forma que a concentração de etanol não ultrapassasse 4% (Welker, 2008). A reação foi iniciada com a adição de CDNB no meio reacional e a taxa de formação do conjugado foi acompanhada durante os primeiros 2 minutos de reação. Uma unidade (U) de GST equivale à

quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol do conjugado por minuto (considerando o $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Em cada análise de atividade de GST das amostras foram utilizados 30 μL de homogenato com diluição 1:5.

C) Atividade Glutaciona peroxidase total

A atividade glutaciona peroxidase total (GPx) foi determinada pela taxa de oxidação de NADPH monitorada pela diminuição da absorbância em 340 nm utilizando cumeno hidroperóxido como molécula alvo da GPx (Paglia e Valentine, 1967; Lawrence e Burk, 1976). A redução do cumeno hidroperóxido pela GPx leva a oxidação da glutaciona reduzida (GSH). A glutaciona oxidada é então reduzida pela GR adicionada ao meio reacional utilizando como substrato redutor o NADPH. Uma unidade (U) de GPx equivale a quantidade de enzima que promove a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O ensaio foi realizado em microplaca, em 200 μL de volume final, em meio tamponado (tampão fosfato 50 mM, pH 7,0) contendo EDTA 0,5 mM, NaN_3 4mM, GSH 5 mM, NADPH 0,2 mM, GR 0,1 U/mL e cumeno hidropeóxido 0,2 mM. As absorbâncias obtidas na microplaca foram corrigidas pela distância do caminho óptico de cada amostra aferida pelo equipamento. A reação foi iniciada pela adição de 8 μM de cumeno hidroperóxido (5 mM), porém, antes da sua adição, o meio reacional foi incubado por pelo menos 3 minutos para estabilização da oxidação basal de NADPH. A concentração da solução de cumeno hidroperóxido em etanol foi verificada antes do ensaio experimental considerando seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{254} = 0,26 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Um branco sem a amostra foi realizado e sua taxa foi subtraída do ensaio teste feito na presença do homogenato. Para análise da atividade GPx, utilizou-se 20 μL de homogenato 1:5 no ensaio experimental.

D) Atividade Glutaciona redutase

A atividade da glutaciona redutase (GR) foi analisada pela taxa de oxidação de NADPH monitorada pela diminuição da absorbância em 340 nm. Segundo o método, a glutaciona oxidada (GSSG) é reduzida pela GR por meio da oxidação de NADPH. Uma

unidade de GR equivale a quantidade de enzima capaz de promover a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O ensaio experimental foi adaptado para microplaca, volume final de 200 μL . O ensaio experimental foi realizado em meio tamponado (tampão fosfato 50 mM, pH 7,0) contendo EDTA 0,5 mM, GSSG 1 mM e NADPH 0,1 mM (Carlberg e Mannervik, 1975; Carlberg e Mannervik, 1985). A reação foi iniciada pela adição de NADPH no meio reacional contendo os demais reagentes. Um branco sem a amostra foi realizado e sua taxa foi subtraída do ensaio teste feito na presença do homogenato. Utilizou-se 10 μL de homogenato 1:10 no ensaio experimental para análise da atividade GR.

E) Atividade glicose-6-fosfato desidrogenase e isocitrato desidrogenase

As atividades das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e isocitrato desidrogenase (ID) foram determinadas pela redução do NADP^+ , analisada pelo aumento da absorbância em 340 nm. Apesar da isocitrato desidrogenase ser conhecida em livro texto por catalizar a descarboxilação oxidativa do isocitrato por meio da redução de NAD^+ , algumas isoformas podem reduzir NADP^+ formando NADPH (Marí et al., 2013). A diferença no método de determinação da atividade G6PDH e ID está no substrato da enzima, uma vez que a G6PDH utiliza glicose-6-fosfato (G6P) e a ID utiliza isocitrato. Ambas as enzimas utilizam íons Mg^{2+} como cofator. Uma unidade de G6PDH e ID equivale a quantidade de enzima capaz de promover a redução de 1 μmol de NADP^+ por minuto, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os ensaios experimentais para determinação da atividade de ambas as enzimas foram realizados em microplaca, em 200 μL de volume final, em meio tamponado com tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), EDTA 0,5 mM e NADP^+ 0,2 mM. Para determinação de G6PDH foi utilizado MgCl_2 5 mM e G6P 1 mM, enquanto que no ensaio de ID foi utilizado MgCl_2 2 mM e isocitrato 0,5 mM (Lushack et al., 2005). A reação foi iniciada pela adição de G6P ou isocitrato no meio reacional. Foram utilizados 15 μL de homogenato 1:50 para determinar as atividades G6PDH e ID.

F) Atividade Aconitase

A atividade aconitase foi realizada segundo protocolo de Gardner (2002). A atividade aconitase foi determinada por meio da taxa de formação de NADPH produzido na reação

catalisada pela isocitrato desidrogenase (ID). A reação catalizada pela ID é dependente da concentração de isocitrato produzido pela aconitase. Portanto a atividade aconitase é determinada utilizando-se concentrações não limitantes de citrato (substrato da aconitase), ID e NADP^+ . O ensaio experimental foi realizado em tampão TRIS (50 mM, pH 7,2) na presença de 5 mM de citrato, 0,2 mM de NADP^+ , 0,6 mM de MnCl_2 e 1 U/mL de ID. A reação foi iniciada com a adição de homogenato no meio e acompanhada por 5 a 10 minutos. O ensaio experimental foi realizado em microplaca, volume final de 200 μL . A produção de NADPH foi monitorada pelo aumento da absorbância em 340 nm e sua taxa foi adquirida durante aumento linear. A atividade foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e considerando a conversão de uma molécula de citrato para uma molécula de NADPH via ID. Uma miliunidade de aconitase corresponde a quantidade de enzima capaz de converter 1 nmol de citrato a isocitrato por minuto (Gardner, 2002). A atividade foi expressa relativo à concentração de proteína presente no extrato.

As amostras de levedura foram coletadas, lavadas em PBS e congeladas logo em seguida em nitrogênio líquido e mantidas à -80°C . As amostras foram homogeneizadas seguindo mesmo protocolo de homogeneização utilizado para as medidas de atividade enzimática (tópico 5.2.9A da seção materiais e métodos). Porém, antes de serem homogeneizadas em vórtex, as amostras foram borbulhadas com N_2 gasosos por 2 minutos para minimizar a oxidação da aconitase durante a homogeneização. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e adicionou-se à amostra citrato na concentração final de 2 mM. Segundo protocolo de Gardner, amostras que possuem baixa atividade aconitase (observado, por exemplo, em células deficientes em SOD) apresentam um fase lag inicial de até 10 minutos devido o acúmulo lento do intermediário cis-aconitase. A adição de citrato na amostra produz isocitrato suficiente para produzir uma rápida taxa inicial de formação de NADPH, minimizando esse atraso na leitura da taxa. As amostras contendo citrato foram mantidas em gelo poucos minutos antes de serem adicionadas ao meio reacional. Para análise da atividade aconitase, utilizou-se 50 μL de homogenato 1:10 no ensaio experimental.

G) Proteínas solúveis totais

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o método de Bradford (1976). Segundo esse método, as proteínas presentes na amostra reagem com o Coomassie Brilliant Blue G-250 formando um complexo que possui pico de absorção em 595 nm. O reagente

contendo Coomassie Brilliant Blue G-250 (reagente de Bradford) foi preparado de acordo com Bradford (1976). Alíquotas dos sobrenadantes das amostras foram coletadas e diluídas para concentração final de 1:200, afim de se obter uma concentração de proteína em torno de 0,1 a 0,3 mg/mL. Em seguida, as amostras foram congeladas e mantidas a -20°C por até uma semana e posteriormente foi realizada a quantificação das proteínas solúveis totais. O procedimento de quantificação de proteínas foi realizado segundo protocolo de Welker (2009). Após serem descongelados, 40 µL de cada amostra foi adicionada a 1,4 mL de reagente de Bradford. A mistura foi homogeneizada vigorosamente em vórtex e, após 2 minutos de incubação, foi realizada a leitura em 595 nm. Os valores de absorvância das amostras foram comparadas com uma curva padrão de albumina bovina feita no dia das análises. A curva foi construída misturando-se 40 µL da solução de albumina bovina na concentração final de 0 a 0,3 mg/mL em 1,4 mL de reagente de Bradford. O procedimento realizado para quantificação de proteína na solução de albumina pelo método de Bradford foi igual ao realizado com as amostras. Antes de proceder a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, a concentração da solução de albumina foi verificada considerando seu coeficiente de absorvância (ϵ) de 6,6 (Tanford e Roberts, 1952).

$$C_{\text{mg/mL}} = (A_{280} \times 10) / \epsilon$$

5.2.10 – Análise estatística

Os resultados foram expressos com as médias \pm erro padrão (EP) de no mínimo 3 experimentos independentes. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS versão 22 (IBM) considerando o nível de significância de 5%. Os valores foram comparados utilizando-se o teste t.

5.3 – Resultados

5.3.1 - Efeito da concentração de menadiona na viabilidade celular nas linhagens de *S. cerevisiae* selvagem e deficientes em SOD.

O resultado de viabilidade celular apresentado na figura 17 mostra de forma qualitativa o efeito da concentração de menadiona na capacidade da levedura de formar novas colônias após insulto com a droga. As linhagens de *S. cerevisiae* estudadas (selvagem e

deficientes em SOD) apresentaram sensibilidade diferente à menadiona. Como era de se esperar, a levedura selvagem apresentou maior resistência à menadiona e algumas células mantiveram-se viáveis mesmo com adição de 50 μM de menadiona no meio de cultura. A levedura deficiente em SOD2, ao contrário da levedura selvagem, tornou-se inviável na presença de 50 μM de menadiona, o que indica que a enzima SOD2 participa da dismutação do ânion radical superóxido produzido pelo ciclo redox da menadiona. Maior sensibilidade foi observada nas linhagens deficientes em SOD1 e no duplo mutante ($\Delta\text{sod1}\Delta\text{sod2}$), sendo esta última praticamente inviável em concentrações superiores a 20 μM de menadiona (figura 17). Esse resultado está de acordo com o resultado de Gralla e Valentine (1991), o qual mostra que, em condição aeróbica, a linhagem deficiente em SOD1 é incapaz de crescer em meio YPD ágar após tratamento com 20 μM de menadiona, enquanto que a linhagem selvagem não apresenta alteração de crescimento na mesma concentração de menadiona (Gralla & Valentine, 1991).

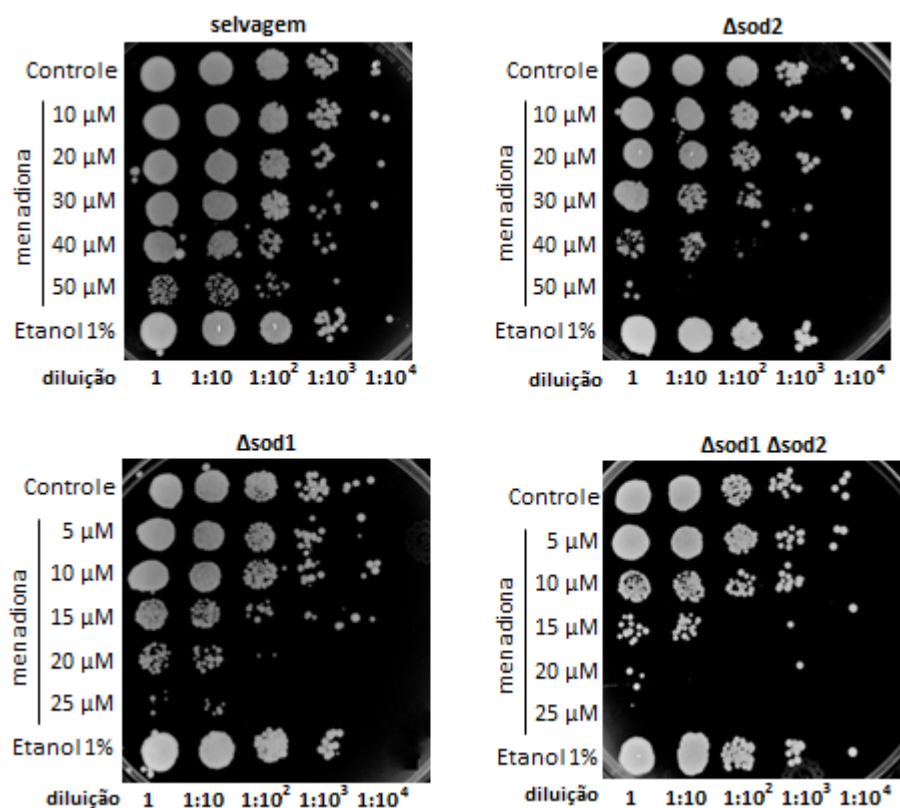


Figura 17: Foto representativa do ensaio de viabilidade das linhagens de *S. cerevisiae* crescidas em meio YPD ágar após tratamento com diferentes concentrações de menadiona. O experimento foi repetido 3 vezes com resultados similares.

A partir dos resultados obtidos com a curva de crescimento e com o ensaio de sensibilidade à menadiona realizados com as quatro linhagens de levedura, optou-se por proceder o estudo com o polifenol AE utilizando apenas as linhagens selvagem e deficiente em SOD1. A escolha de tais linhagens foi embasada nos resultados preliminares que mostraram que a linhagem Δsod1 possui sensibilidade à menadiona semelhante à linhagem $\Delta\text{sod1}\Delta\text{sod2}$, porém a primeira não apresenta o atraso significativo de crescimento observado na segunda (vide figura 14 e 17). A linhagem Δsod2 foi excluída do estudo por possuir sensibilidade à menadiona muito semelhante à linhagem selvagem e por não apresentar um fenótipo tão deletério quanto a linhagem Δsod1 . Além disso, a concentração de 15 μM de menadiona foi escolhida para realização dos próximos ensaios experimentais. O resultado de viabilidade celular mostra que esta concentração promove um estresse significativo na levedura Δsod1 , diminuindo sua capacidade de formar novas colônias, porém confere um menor efeito à levedura selvagem. Portanto, a escolha dessa concentração de menadiona permite avaliar de forma mais efetiva o papel da enzima SOD1 no estresse oxidativo induzido por menadiona em levedura. Além disso, ajuda a entender como o polifenol AE age em situação de maior ou menor estresse oxidativo.

5.3.2 - Efeito da incubação prévia com o polifenol AE na viabilidade de leveduras selvagem e deficiente em SOD1 tratadas com menadiona.

A viabilidade das leveduras submetidas ao estresse com menadiona foi quantificada por meio do número de colônias formadas após plaqueamento em meio YPD ágar (para maiores detalhes vide tópico 5.2.5 na seção de materiais e métodos). Os resultados de viabilidade apresentados na figura 18 mostram que a adição de 15 μM de menadiona diminui aproximadamente 60% da viabilidade da linhagem selvagem, enquanto que na linhagem Δsod1 , essa queda da viabilidade é de aproximadamente 90%. Novamente observa-se que a linhagem Δsod1 apresenta maior sensibilidade à menadiona devido a ausência da SOD1 no citosol e no espaço intermembrânico da mitocôndria. A redução da viabilidade promovida pela adição de 15 μM de menadiona na levedura selvagem está de acordo com o observado no ensaio qualitativo apresentado na figura 17, na qual é possível observar claramente nas diluições de 1:10² e 1:10³ que 20 μM de menadiona diminui a população de colônias formadas da levedura selvagem.

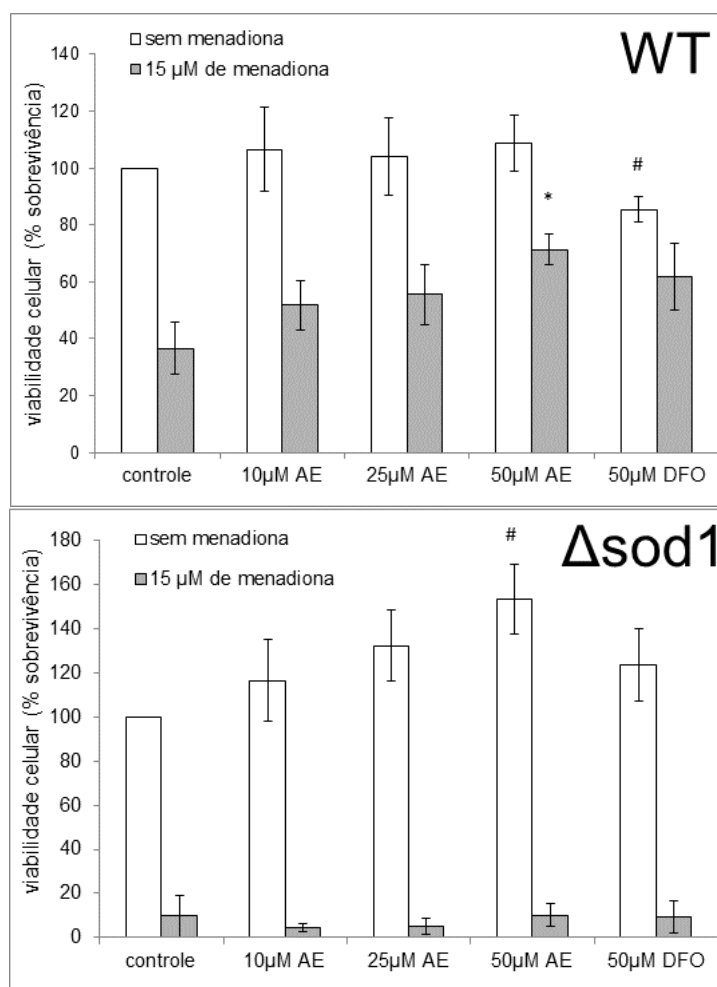


Figura 18: Efeito da concentração de AE na viabilidade de leveduras selvagem (WT - gráfico superior) e Δ sod1 (gráfico inferior) tratadas com 15 μ M de menadiona. O efeito da incubação prévia com AE (10-50 μ M) por 5 horas foi comparado com o quelante DFO (50 μ M). Os gráficos mostram os valores relativos de viabilidade em relação ao respectivo controle não tratado com antioxidante e menadiona. Resultados correspondem as médias \pm erro padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. * significativamente diferente do grupo controle tratado com 15 μ M de menadiona. # significativamente diferente do grupo controle sem menadiona. ($p < 0,05$)

A incubação prévia com AE melhora de forma dose dependente a viabilidade da linhagem selvagem tratada com menadiona. Porém, um aumento significativo de 35% na viabilidade só foi observado na presença de 50 μ M de AE. A perda da viabilidade da linhagem Δ sod1 promovida pela adição de 15 μ M de menadiona não é revertida com o tratamento prévio com AE em nenhuma concentração do polifenol. Por outro lado, a incubação prévia com AE melhora a viabilidade das células Δ sod1 não tratadas com menadiona também de forma dose dependente. É importante ressaltar que essa melhora da viabilidade da célula não tratada com menadiona não é observada na linhagem selvagem.

Esse resultado indica que a linhagem Δ sod1 apresenta um estresse “natural” (ausência da enzima SOD1) durante seu crescimento em meio contendo 2% de glicose e alta aeração (proporcionada pela razão volume do frasco:volume do meio de 5:1 e agitação de 200 rpm). O estresse promovido por essa condição de crescimento é minimizada pela incubação das células com AE por 5 h.

O efeito protetor do AE foi comparado com o quelante desferroxamina (DFO). A incubação prévia com 50 μ M de DFO não oferece efeito protetor significativo contra o estresse oxidativo promovido pela menadiona tanto na linhagem selvagem quanto na Δ sod1. A incubação prévia com concentrações maiores de DFO (250 μ M) também não promoveu efeito benéfico satisfatório (figura 19). Ao contrário do que foi observado com o AE, o tratamento prévio com DFO promove uma pequena diminuição da viabilidade da levedura selvagem, porém, esse efeito não é observado na linhagem Δ sod1 (figura 18).

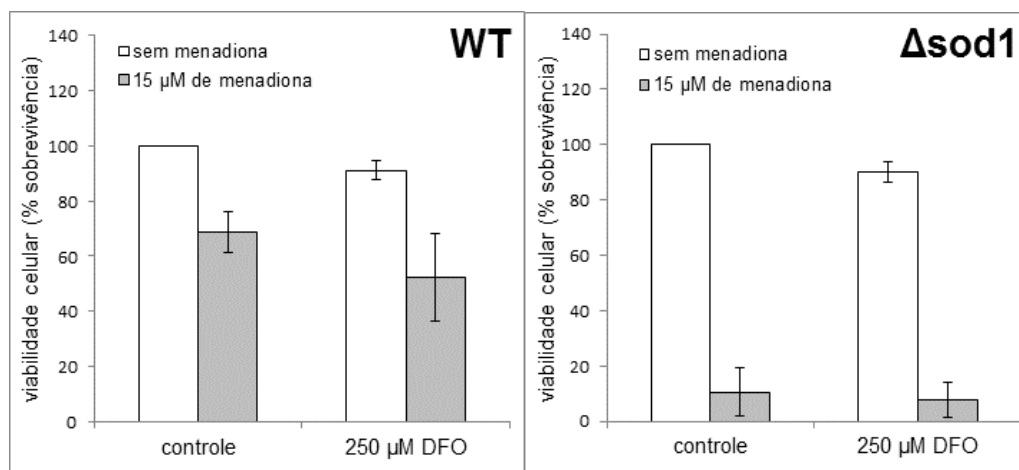


Figura 19: Efeito da incubação prévia com 250 μ M de DFO na viabilidade das linhagens selvagem (WT – gráfico da esquerda) e deficiente em SOD1 (Δ sod1 – gráfico da direita) tratadas com 15 μ M de menadiona. Resultados correspondem as médias \pm erro padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

Acredita-se que o fato do AE não ter apresentado efeito protetor em leveduras Δ sod1 tratadas com 15 μ M de menadiona se deve à utilização de uma dose alta de menadiona que gerou grande estresse na célula incapacitando-a de formar novas colônias. A comprovação que o AE possui efeito protetor também na linhagem deficiente em SOD1 foi feita utilizando-se uma concentração menor de menadiona (5 μ M) (figura 20). A indução do estresse

promovida pela adição de 5 μM de menadiona no meio celular diminui a viabilidade das células Δsod1 para 48%. O tratamento prévio com 50 μM de AE restabelece parte da viabilidade das células, a qual passa a se equiparar ao grupo sem AE não tratado com menadiona (figura 20). Novamente, é possível observar que a adição de AE promove aumento significativo da sobrevivência das células Δsod1 não tratadas com menadiona.

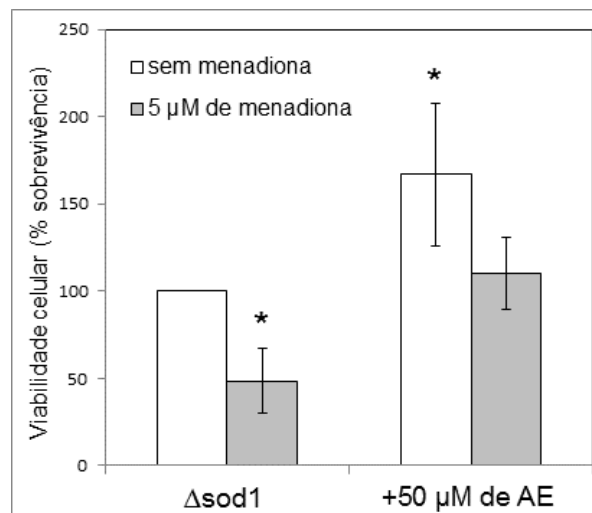


Figura 20: Efeito da incubação prévia com 50 μM de AE na viabilidade da levedura Δsod1 tratada com 5 μM de menadiona. Resultados correspondem as médias \pm erro padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. * significativamente diferente do ensaio realizado sem AE e menadiona ($p < 0,05$).

A perda da capacidade da célula de formar uma nova colônia proporcionada pela menadiona indica que essa droga promove um estresse que a impede de crescer e se multiplicar naturalmente no meio de cultivo. Porém, este estado não confirma se a célula encontra-se viável e metabolicamente ativa nem mesmo se de fato está em situação de estresse oxidativo (Salma et al. 2013; Oliver, 2005). A situação de desbalanço na produção de espécies reativas pode ser observada pela razão glutatona oxidada/glutatona total, a qual demonstra a proporção de glutatona disponível que foi oxidada em uma situação de estresse radicalar. O tripeptídeo glutatona é o tiol de baixo peso molecular mais abundante no organismo e o principal responsável por manter esse equilíbrio redox da célula (Bachhawat et al., 2013; Deponte, 2013). A glutatona reduzida (GSH) possui papel fundamental contra o estresse oxidativo, uma vez que participa da remoção de diversos xenobióticos, regenera outras moléculas antioxidantes e age como tampão redox na célula (Deponte, 2013). Sendo

assim, foi realizada a quantificação de glutathiona total e de glutathiona oxidada (GSSG) para analisar se o insulto realizado com 15 μM de menadiona altera o nível de estresse oxidativo nas linhagens selvagem e Δsod1 . Além disso, procurou-se investigar o efeito do tratamento prévio com o polifenol AE na concentração de glutathiona total e oxidada.

5.3.3 - Efeito do AE na concentração de glutathiona total e oxidada em leveduras selvagem e deficiente em SOD1 tratadas com menadiona.

As leveduras selvagem e Δsod1 em início de fase exponencial apresentam concentrações semelhantes tanto de glutathiona total quanto de glutathiona oxidada quando não são submetidas ao estresse oxidativo (vide tabela 2). O tratamento prévio com AE aumenta a concentração de glutathiona total tanto nas células selvagens quanto nas células Δsod1 (figura 21, gráficos A e D). A levedura selvagem tratada com 50 μM de AE apresenta aumento de 65% no total de glutathiona, enquanto que a levedura Δsod1 apresenta aumento médio de aproximadamente 91% e 75% de GSH-eq após tratamento com 25 e 50 μM de AE, respectivamente. Ao contrário do que foi observado com o AE, o tratamento prévio com DFO não altera a concentração de glutathiona total em nenhuma das duas linhagens. A indução do estresse promovida pela adição de 15 μM de menadiona não altera a concentração de GSH-eq em nenhuma das linhagens de levedura em quaisquer condições experimentais (vide colunas cinza dos gráficos superiores). Porém, as amostras tratadas previamente com AE que apresentaram aumento no total de glutathiona tendem a diminuir sua concentração de GSH-eq após o estresse induzido por menadiona. Diminuição significativa ($p=0,05$) na concentração de GSH-eq foi observada após o insulto com 15 μM de menadiona na amostra de levedura Δsod1 pré-incubada com 25 μM de AE (figura 21, gráfico D). Resultado semelhante também foi observado nas células Δsod1 tratada com 50 μM de DFO.

A adição de 15 μM de menadiona aumenta em aproximadamente 10 vezes a concentração de GSSG da linhagem Δsod1 , enquanto que os níveis de GSSG da levedura selvagem se mantêm constante mesmo após adição de menadiona (figura 21, gráficos B e E). Os tratamentos prévios com 25 μM e 50 μM de AE diminuem aproximadamente 60% da concentração de GSSG em leveduras Δsod1 tratada com menadiona quando comparada com seu controle não tratado com AE. A diminuição na concentração de GSSG pelo AE promove uma tendência de queda na razão GSSG/GSH-eq o que demonstra que o AE apresenta ação antioxidante, prevenindo o estresse oxidativo da levedura Δsod1 . Em contra partida, o

tratamento com 50 μM de DFO não promove a diminuição dos níveis de GSSG nessa linhagem de levedura.

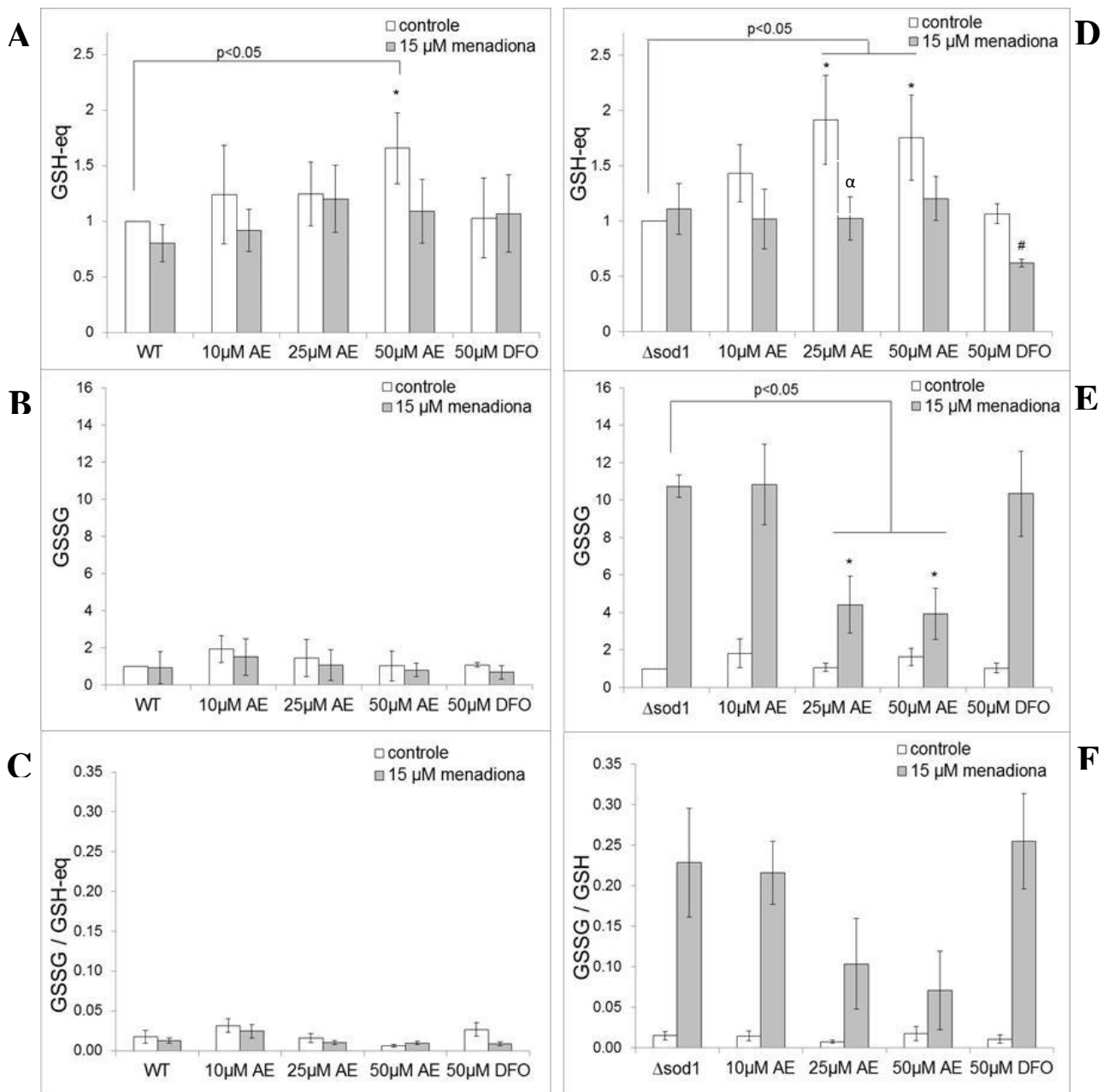


Figura 21: Valores relativos de glutatona total (GSH-eq) (**gráficos A e D**) e oxidada (GSSG) (**gráficos B e E**) em leveduras selvagem (**gráficos da esquerda**) e Δsod1 (**gráficos da direita**). Efeito do tratamento com 15 μM de menadiona e da incubação prévia por 5 horas com AE (10-50 μM) ou DFO (50 μM) na concentração de GSH-eq e GSSG em ambas linhagens. Os valores relativos de GSH-eq e GSSG foram comparados com seu respectivo controle sem antioxidante e menadiona. **Gráficos C e F** correspondem ao valores médios de GSSG/GSH-eq das linhagens selvagem e Δsod1 respectivamente. Resultados correspondem as médias \pm erro padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. α : significativamente diferente do grupo tratado com 25 μM de AE não submetido ao estresse com menadiona ($p=0,05$). #: significativamente diferente do grupo tratado com 50 μM de DFO não submetido ao estresse com menadiona ($p<0,05$).

Tabela 2: Valores absolutos da concentração de glutatona total (GSH-eq) e GSSG e da razão GSSG/GSH-eq encontrados nas linhagens selvagem e Δ sod1.

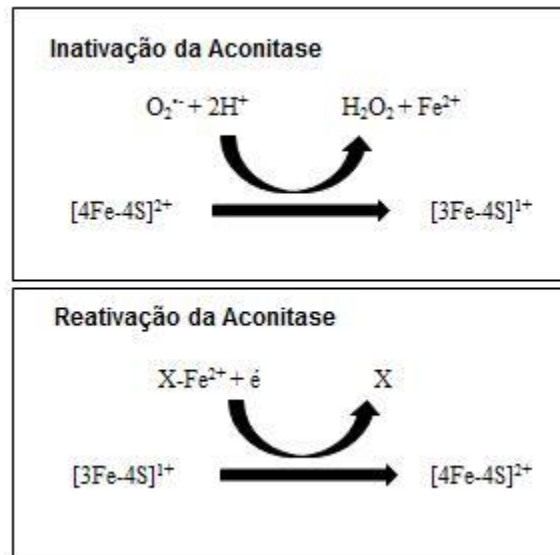
Linhagem/condição experimental	GSH-eq*	GSSG*	GSSG/GSH-eq
Linhagem selvagem			
Controle	9,64 ± 1,89	0,13 ± 0,04	0,017 ± 0,008
+ 10 μM AE	11,29 ± 2,45	0,31 ± 0,08	0,032 ± 0,009
+ 25 μM AE	11,72 ± 2,52	0,17 ± 0,05	0,016 ± 0,006
+ 50μM AE	15,28 ± 2,09	0,09 ± 0,03	0,006 ± 0,002
+ 50 μM DFO	9,46 ± 2,12	0,21 ± 0,07	0,027 ± 0,009
Menadiona 15 μM			
Controle	7,71 ± 1,74	0,09 ± 0,03	0,012 ± 0,003
+ 10 μM AE	8,80 ± 2,09	0,17 ± 0,04	0,024 ± 0,009
+ 25 μM AE	10,83 ± 1,09	0,11 ± 0,03	0,011 ± 0,002
+ 50μM AE	10,09 ± 1,79	0,09 ± 0,01	0,010 ± 0,002
+ 50 μM DFO	10,21 ± 2,13	0,07 ± 0,01	0,009 ± 0,002
Linhagem Δsod1			
Controle	8,44 ± 2,12	0,10 ± 0,03	0,015 ± 0,005
+ 10 μM AE	11,31 ± 2,35	0,13 ± 0,04	0,015 ± 0,006
+ 25 μM AE	14,48 ± 2,26	0,09 ± 0,01	0,007 ± 0,002
+ 50μM AE	13,24 ± 1,88	0,19 ± 0,10	0,018 ± 0,009
+ 50 μM DFO	12,13 ± 2,98	0,09 ± 0,02	0,011 ± 0,005
Menadiona 15 μM			
Controle	8,40 ± 1,19	1,25 ± 0,24	0,228 ± 0,067
+ 10 μM AE	7,46 ± 0,92	1,25 ± 0,14	0,216 ± 0,039
+ 25 μM AE	7,54 ± 0,63	0,58 ± 0,28	0,104 ± 0,056
+ 50μM AE	9,14 ± 1,11	0,50 ± 0,26	0,071 ± 0,049
+ 50 μM DFO	5,08 ± 1,09	0,87 ± 0,10	0,255 ± 0,059

Valores correspondem a médias \pm erros padrão de 4 experimentos independentes. *Valores expressos em nmol/mg de proteína

5.3.4 - Atividade aconitase

A medida da atividade da enzima aconitase serve como sensor da presença de $O_2^{\cdot-}$ na célula (Gardner, 1997). O $O_2^{\cdot-}$ ataca o átomo de ferro do grupamento $[4Fe-4S]^{2+}$ causando a oxidação de um elétron do grupamento Fe-S, a liberação do átomo de ferro no estado ferroso e a perda da atividade da enzima (Gardner, 2002). A aconitase pode ser rapidamente

reativada *in vitro* ou *in vivo* por meio da redução do grupamento de Fe-S e a reintrodução do íon ferroso (Garner & Fridovich, 1993). Outros oxidantes fisiológicos incluindo O_2 , H_2O_2 e $ONOO^-$ também podem atacar o grupamento Fe-S, porém com constantes de reação menores que a do $O_2^{\cdot-}$, que alcança valores da ordem de $10^7 M^{-1} s^{-1}$ (Castro et al., 1994).



Esquema 4: Inativação da aconitase pelo $O_2^{\cdot-}$ com a liberação de Fe^{2+} do grupamento Fe-S (esquema superior). Reativação da aconitase por meio da reintrodução do Fe^{2+} e redução do grupamento Fe-S (esquema inferior). *Adaptado de Gardner, 2002.*

O gráfico 22 mostra o resultado de atividade aconitase obtida nas duas linhagens de levedura após tratamento com AE e/ou menadiona. Observa-se que, em condições basais (ausência de tratamento com AE ou menadiona), a levedura selvagem apresenta atividade aconitase cerca de 3 vezes maior do que a obtida na levedura $\Delta sod1$. A adição de $15 \mu M$ de menadiona ou mesmo o tratamento prévio com AE não promovem alteração significativa da atividade da enzima na levedura selvagem (WT). Esse resultado indica que a SOD1 é capaz de dismutar o $O_2^{\cdot-}$ excedente que foi produzido durante a metabolização dessa quantidade de menadiona. Por outro lado, a atividade da enzima aconitase da levedura $\Delta sod1$ diminui proporcionalmente à concentração de menadiona no meio (5 e $15 \mu M$). A adição de $15 \mu M$ de menadiona na levedura $\Delta sod1$ inibe 77% da atividade aconitase do grupo não tratado com AE, enquanto que no grupo tratado com $50 \mu M$ de AE, esse percentual de inibição é de 87%. O tratamento prévio com $50 \mu M$ AE não impede o decaimento da atividade aconitase promovida pela menadiona, o que indica que o AE não interfere na produção de $O_2^{\cdot-}$ ou mesmo no processo de dismutação desse radical livre. É interessante observar que a pré-

incubação com AE tende a aumentar a atividade da enzima aconitase tanto na levedura selvagem quanto na levedura Δ sod1, porém esse aumento não é significativo.

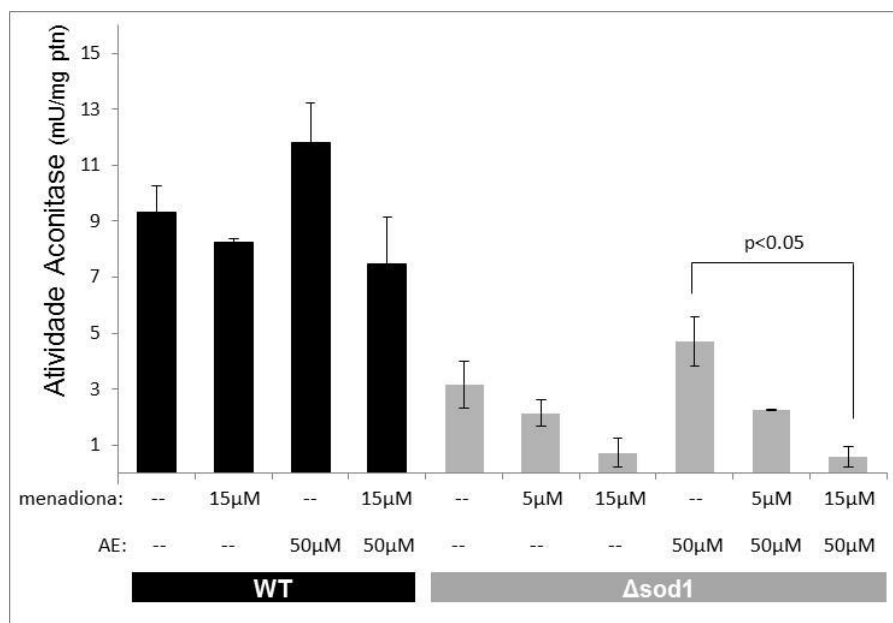


Figura 22: Efeito da menadiona e do AE na atividade aconitase da levedura selvagem (barra preta) e Δ sod1 (barra cinza). Resultados correspondem as médias \pm erro padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

5.3.5 - Análise da permeabilidade de membrana analisada por citometria de fluxo

A fluidez de membrana foi analisada por citometria de fluxo por meio da quantificação da fluorescência da célula após incubação com o fluoróforo iodeto de propídio (IP). O resultado apresentado na figura 23 mostra que a adição de 15 ou 30 μ M de menadiona não altera a fluidez da membrana da levedura selvagem. Por outro lado, essa mesma concentração de menadiona (15 e 30 μ M) promove um pequeno deslocamento da intensidade de fluorescência na população de células da linhagem Δ sod1. Isso indica que a menadiona provoca danos oxidativos à membrana celular da linhagem Δ sod1, alterando a sua permeabilidade e permitindo, dessa forma, a entrada do IP na célula. Além disso, verifica-se que o deslocamento da fluorescência é proporcional à concentração de menadiona, comprovando que o dano oxidativo promovido pela menadiona é dependente da sua concentração no meio. O deslocamento pequeno da fluorescência na levedura Δ sod1 promovido pela menadiona mostra que essa concentração de droga não é capaz de levar à morte celular, uma vez que células mortas foram identificadas com fluorescência na ordem de 10^3 (vide figura 16 da seção materiais e métodos).

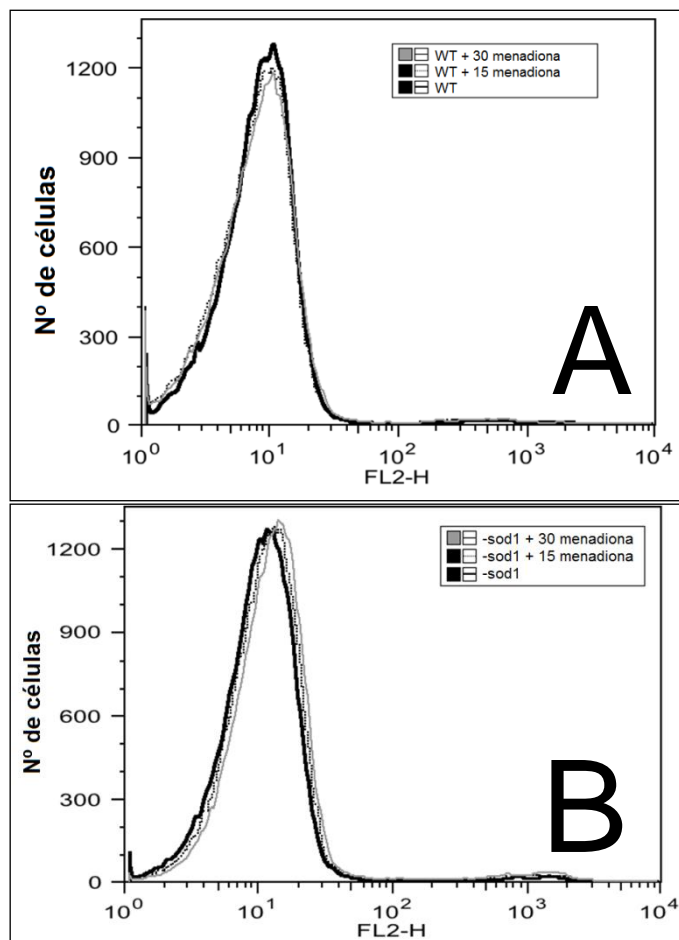


Figura 23: Gráficos representativos do efeito da adição de 15 e 30 μ M de menadiona na permeabilidade de membrana de leveduras selvagem (gráfico A) e Δ sod1 (gráfico B). Após incubação por 2 horas com menadiona, as células foram coletadas, lavadas, com PBS e ressuspensas com 50 μ g/mL de IP. As células foram mantidas sob abrigo de luz por 30 minutos e a análise de fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo. Os gráficos acima correspondem ao resultado adquirido de um único experimento (n1), porém esse experimento foi repetido 3 vezes e apresentou resultados similares.

A alteração da permeabilidade de membrana na linhagem Δ sod1 indica que houve danos oxidativos nessa linhagem induzido por menadiona. Segundo os estudos que analisaram a composição dos lipídios de membrana de *S cerevisiae* (plasmática e mitocondrial), a levedura possui essencialmente ácidos graxos saturados e monoinsaturados esterificados aos fosfolipídeos (Cortés-Rojo et al., 2009; Pedroso et al., 2009). Segundo estudo de Pedroso e colaboradores (2009), os ácidos oleico (C18:1), palmítoleico (C16:1) e palmítico (C16:0) são os ácidos graxos de cadeia longa mais abundantes na membrana plasmática de levedura. A baixa concentração de ácidos graxos poli-insaturados dificulta a peroxidação lipídica e os níveis de TBARS, por exemplo, mantêm-se baixos mesmo após

incubação do extrato lipídico da levedura com 100 μM de Fe^{2+} (Cortés-Rojo et al., 2009). Por outro lado, a adição ácido linolênico (C18:3) ao meio de cultura promove à incorporação do ácido graxo na membrana, o que faz com que a célula se torne sensível à peroxidação lipídica (Cortés-Rojo et al., 2009).

Além dos ácidos graxos, a membrana de fungos é composta por ergosterol, um lipídio que possui papel fundamental tanto na permeabilidade e fluidez de membrana quanto na formação de micro-domínios que influenciam na funcionalidade de proteínas ancoradas à membrana (Dupont et al., 2012). O ergosterol não reage com o radical superóxido ou com o peróxido de hidrogênio, mas é rapidamente oxidado pelo oxigênio singlete e radical hidroxil formando hidroperóxidos e epidióxidos de ergosterol (Bocking et al., 2000).

A pequena alteração do perfil de fluorescência obtido por citometria de fluxo e a dificuldade em analisar peroxidação lipídica por TBARS relatada em outros estudos fez com que optássemos por fazer a análise de lipídios oxidados nas amostras de levedura pelo método de HPLC. Os cromatogramas obtidos a partir da extração dos lipídios de membrana de levedura foram comparados com o cromatograma do ergosterol foto-oxidado a fim de identificar os produtos de oxidação do ergosterol nas amostras experimentais.

5.3.6 - Análise de lipídios oxidados por HPLC.

O protocolo de separação utilizado (vide materiais e métodos) permitiu a detecção do ergosterol com tempo de retenção de aproximadamente 10,9 minutos. Após ser submetido à foto-oxidação por 5 minutos, parte do ergosterol é oxidado, levando a formação de produtos mais hidrofílicos. Tal resultado pode ser observado na figura 24, onde se nota uma diminuição do pico com tempo de retenção de 10,9 minutos (ergosterol) e formação de 3 novos picos, com tempos de retenção de 5,039; 5,31 e 5,68 minutos (produtos de oxidação). Após 30 minutos de foto-oxidação, o pico do ergosterol desaparece do cromatograma e, além do surgimento de um pico com tempo de retenção de 9,165 minutos, verifica-se um aumento da intensidade dos picos com tempos de retenção supracitados. Apesar de não terem sido caracterizados, o aparecimento de novos picos com menores tempos de retenção demonstra que houve oxidação do ergosterol pelo oxigênio singlete, o que acarretou na formação de múltiplos produtos de oxidação.

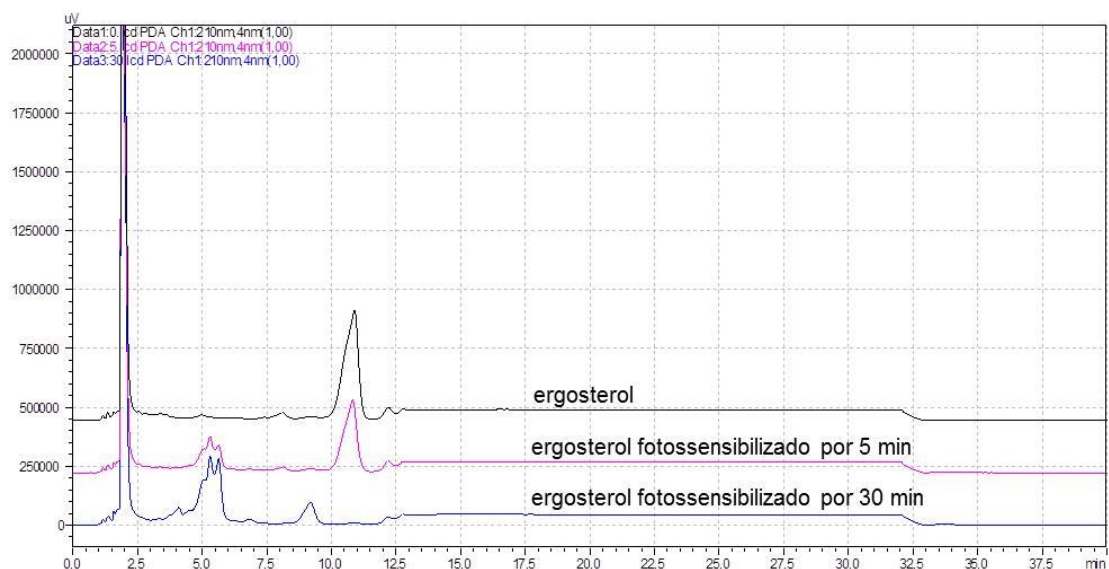


Figura 24: Perfil cromatográfico de ergosterol puro (10 mg/mL) e ergosterol fotossensibilizado por 5 e 30 minutos com 100 μ M de azul de metileno.

Os cromatogramas apresentados na figura 25 correspondem aos lipídios extraídos de leveduras selvagem (gráfico A) e Δ sod1 (gráfico B) pré-incubadas por 5 horas com AE (0 ou 50 μ M) e submetidas ao estresse com 0, 5 ou 15 μ M de menadiona (MN) por 2 horas. Os cromatogramas das amostras de levedura revelam que existe uma pequena diferença na composição lipídica da levedura selvagem quando comparada à levedura deficiente em SOD1. A levedura Δ sod1 apresenta picos de maior intensidade em 283 nm nos tempos de retenção 9,6; 12,2 (também observado em 210 nm – figura 25); e 23,8 minutos (figura 26). Por outro lado, não foi verificada alteração significativa do cromatograma das células tratadas com menadiona de ambas as linhagens em comparação com seus respectivos controles. O tratamento prévio com AE também não promoveu mudança significativa no cromatograma. Além disso, a concentração de ergosterol se manteve igual em todas as condições experimentais (figura 27). O conjunto de resultados extraídos a partir dos cromatogramas indica que não foi observado aumento de peroxidação lipídica promovido pela menadiona

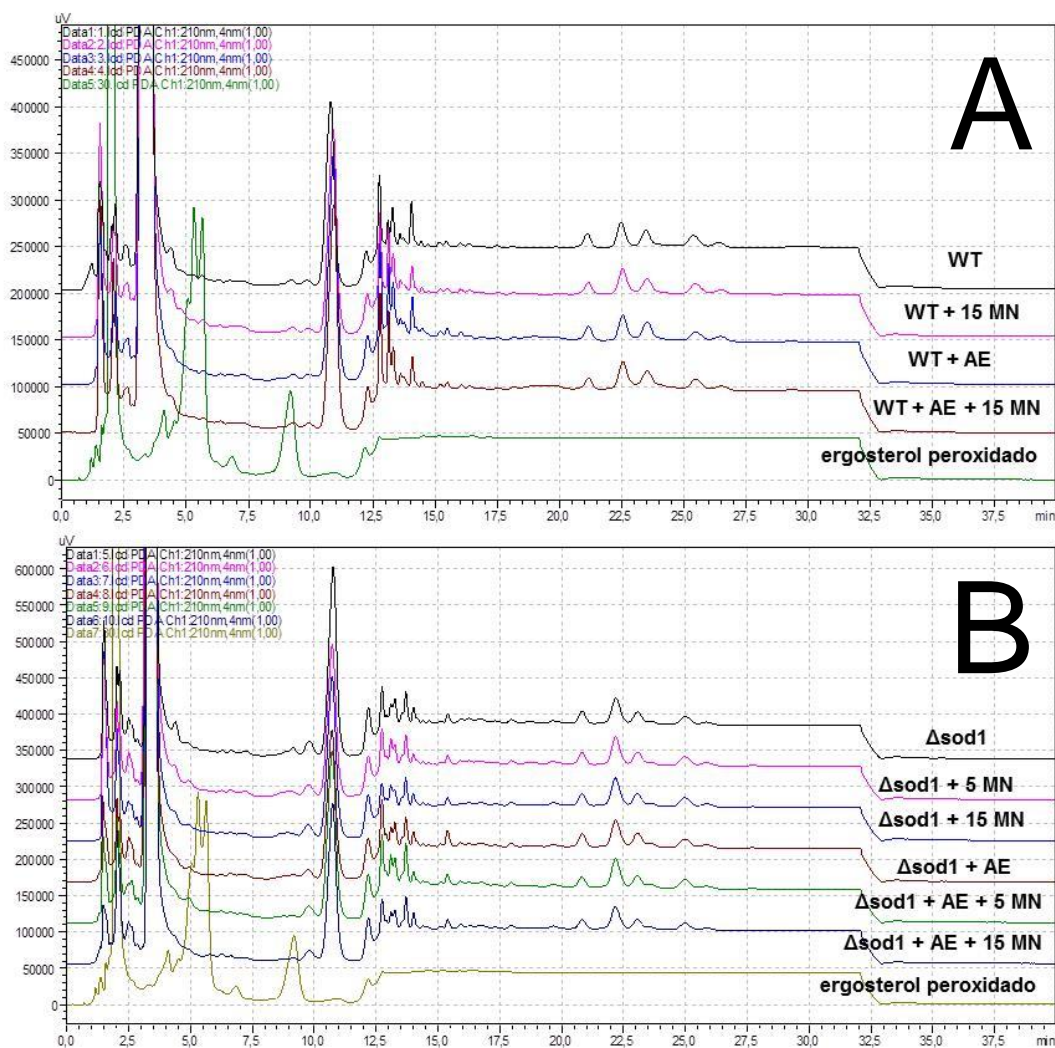


Figura 25: Cromatogramas obtidos em 210 nm dos lipídios extraídos das amostras de levedura selvagem (WT - gráfico A) e Δ sod1 (gráfico B). Leveduras de início de fase exponencial foram ressuspensas em PBS e pré-incubadas por 5 horas com 0 ou 50 μ M de AE. Em seguida, adicionou-se menadiona na (MN) concentração final de 0, 5 ou 15 μ M e incubou-se por 2 horas. As células foram coletadas e os lipídios foram extraídos para a analisados por HPLC. Os cromatogramas foram obtidos paralelamente com o do ergosterol fotossensibilizado por 30 minutos (cromatograma inferior apresentado nos gráficos A e B)

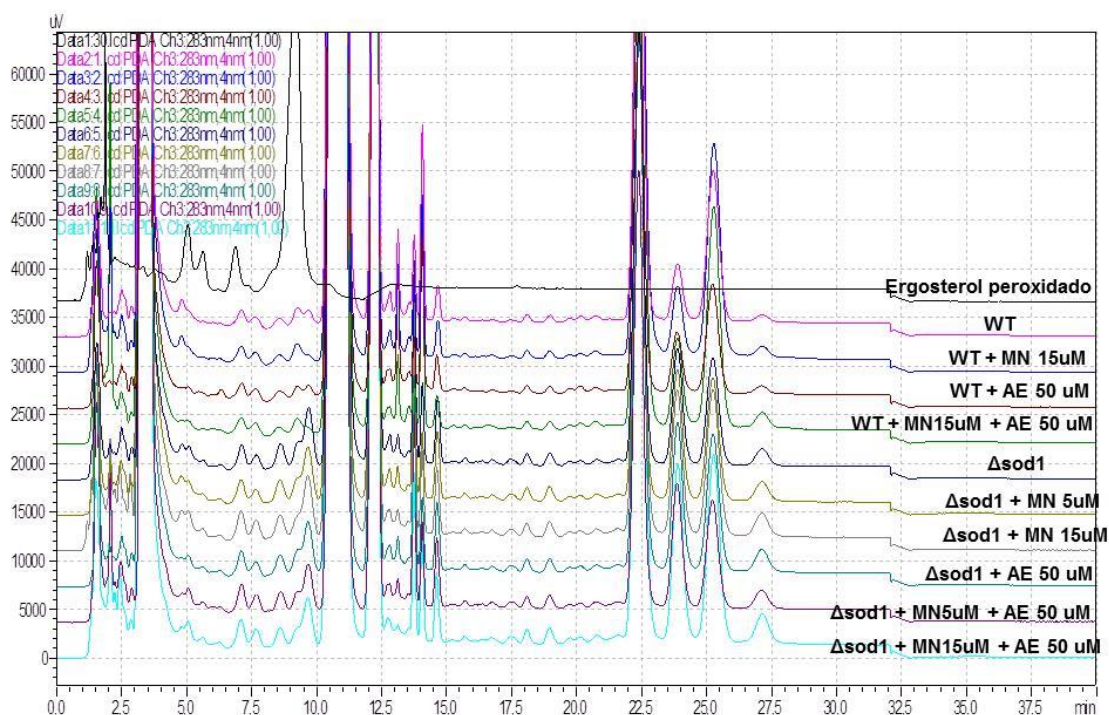


Figura 26: Cromatogramas obtidos em 283 nm dos lipídios extraídos das amostras de levedura selvagem (WT) e Δ sod1. As leveduras de início de fase exponencial foram ressuspensas em PBS e pré-incubadas por 5 horas com 0 ou 50 μ M de AE. Em seguida, adicionou-se menadiona na (MN) concentração final de 0, 5 e 15 μ M e incubou-se por 2 horas. As células foram coletadas e os lipídios foram extraídos para a analisados por HPLC. Os cromatogramas foram obtidos paralelamente com o do ergosterol fotossensibilizado por 30 minutos (cromatograma superior).

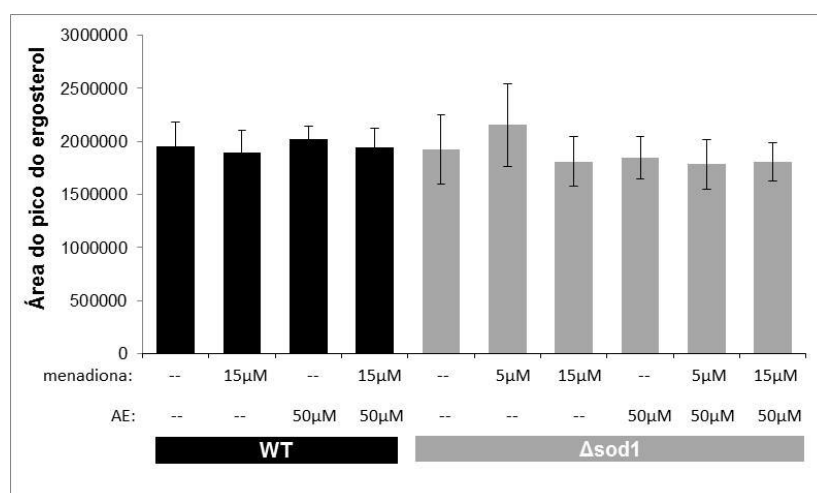


Figura 27: Área do pico do ergosterol (tempo de retenção de 10,9 minutos) analisado em 283 nm. Resultado extraído da figura 26. Resultados correspondem as médias \pm desvios padrões de 3 experimentos independentes.

5.3.7 - Atividade de enzimas antioxidantes

Os resultados apresentados na figura 28 mostram as atividades das enzimas glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST), enzimas que utilizam a glutathione como substrato ou co-substrato. A atividade da GR encontra-se aumentada nas leveduras submetidas à pré-incubação com AE e ao estresse com a menadione (figura 28A). A levedura selvagem tratada com 50 μM de AE e 15 μM de menadione apresentou aumento médio de 25% na atividade GR, porém não foi significativamente diferente do controle sem AE e menadione. Por outro lado, a atividade da GR da levedura Δsod1 tratada com 50 μM de AE e 5 e 15 μM de menadione apresentou aumento significativo de 35% a 20% ($p < 0,05$), respectivamente.

O tratamento com menadione não altera a atividade da GPx da levedura selvagem e Δsod1 (figura 28B). A levedura Δsod1 apresenta uma atividade GPx 50% maior do que a levedura selvagem. Por outro lado, a pré-incubação da levedura Δsod1 com AE tende a diminuir a atividade GPx, porém, essa diminuição não é significativa (teste t realizado entre o grupo Δsod1 sem AE e menadione e os demais grupos da mesma linhagem não apresentou diferença estatística). A atividade GPx das amostras de levedura Δsod1 tratadas com AE volta a se equiparar à da levedura selvagem, o que demonstra que o AE interfere na atividade GPx da linhagem Δsod1 .

A atividade GST não mostrou ser significativamente diferente entre as duas linhagens de levedura (figura 28C). Além disso, não há diferença significativa na atividade GST após pré-incubação com AE ou tratamento com menadione.

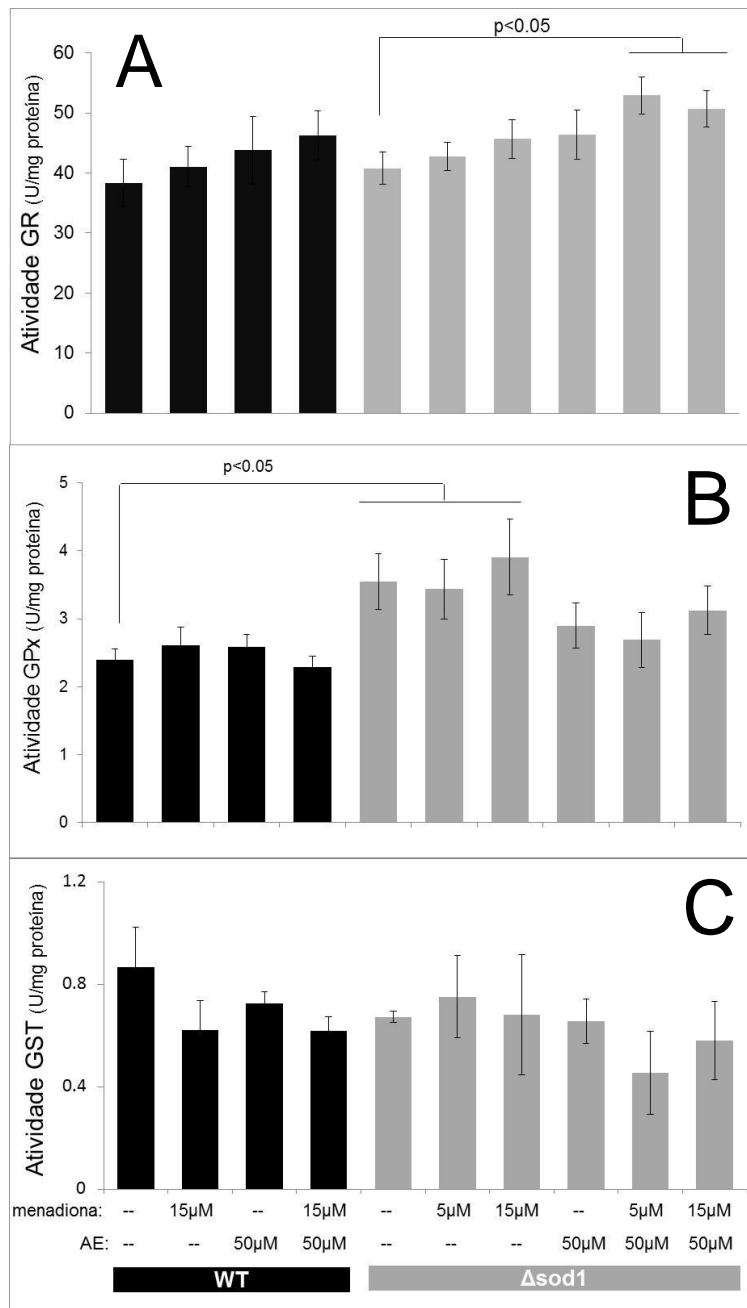


Figura 28: Atividade GR (painel A), GPx (painel B) e GST (painel C) das amostras de leveduras selvagem e Δ sod1 pré-incubadas por 5h com 0 e 50 μ M de AE e submetidas ao estresse com 0, 5 ou 15 μ M de menadiona. Resultados correspondem as médias \pm erro padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

A atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e isocitrato desidrogenase (ICDH) também foram analisadas, uma vez que elas fornecem NADPH para a célula. O NADPH é o substrato redutor da GR, enzima responsável por reduzir GSSG formando duas moléculas de GSH (para maiores detalhes vide tópico 2.4.4 da revisão bibliográfica). A atividade G6PDH e ICDH de ambas as linhagens não altera com o tratamento com AE e/ou menadiona (figura 29). Além disso, não há diferença na atividade dessas enzimas entre as linhagens selvagem e Δ sod1. É interessante observar que apesar da atividade GR está aumentada na linhagem Δ sod1 pré-incubada com AE e estressada com menadiona, esse aumento não é acompanhado por uma maior atividade das enzimas G6PDH e ICDH.

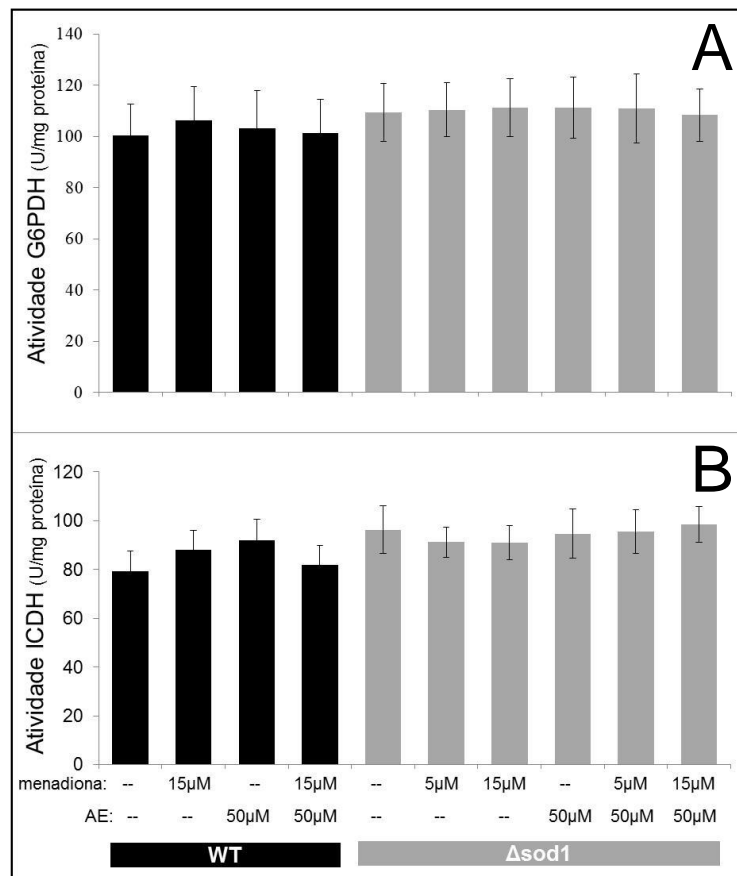


Figura 29: Atividade G6PDH (painel A), ICDH (painel B) das amostras de leveduras selvagem e Δ sod1 pré-incubadas por 5h com 0 e 50 μ M de AE e submetidas ao estresse com 0, 5 ou 15 μ M de menadiona. Resultados correspondem as médias \pm erro padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

5.4 - Discussão

A menadiona é uma quinona utilizada em diversos estudos de estresse oxidativo em células devido sua capacidade de gerar EROs. Enzimas redutases podem reduzir a menadiona em 1 ou 2 elétrons, influenciando no seu ciclo redox. A NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1, presente no citosol) leva à redução em 2 elétrons formando uma hidroquinona (QH₂) que é menos reativa e menos tóxica para o organismo celular (Siegel et al., 2004). Demais redutases tais como a NADPH-citocromo P450 redutase (enzima microsomal) e NADH-ubiquinona oxidoreductase (complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons) reduzem a menadiona em 1 elétron formando radical semiquinona (Q^{•-}). A formação do radical semiquinona faz com que a metabolização da menadiona entre num ciclo redox que leva a geração de EROs. Nessa reação, o radical semiquinona é rapidamente oxidado pelo oxigênio molecular formando novamente quinona e radical superóxido (O₂^{•-}) (figura 30) (Watanabe et al., 2004). O O₂^{•-} gerado no ciclo redox da quinona pode ser dismutado espontaneamente – ou via ação catalítica da SOD – formando H₂O₂ e O₂.

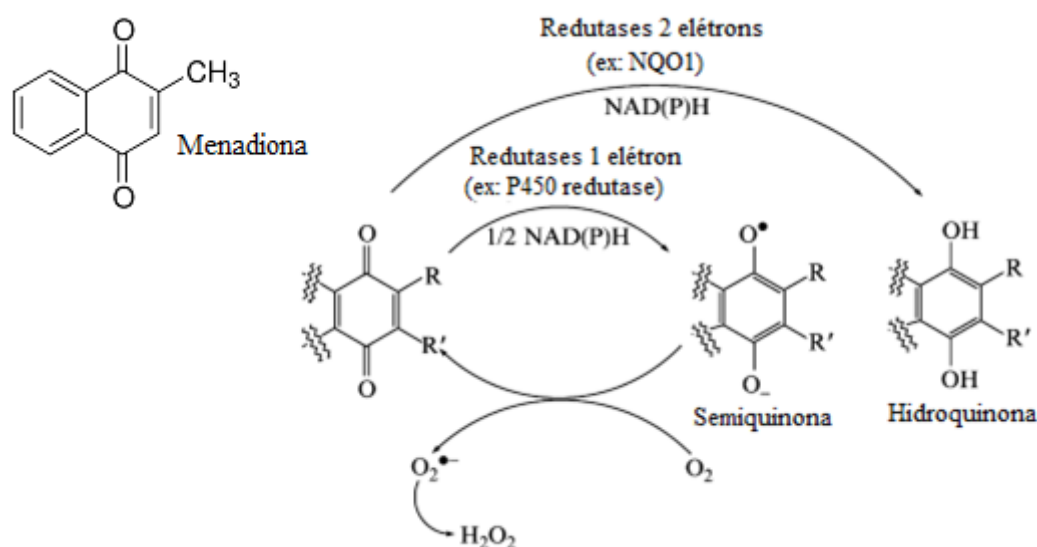
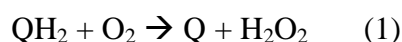


Figura 30: Ciclo redox da menadiona. Adaptado de Watanabe et al., 2004.

O metabolismo da menadiona via NQO1 diminui a produção de semiquinona por meio da formação de hidroquinona que é menos reativa e menos tóxica à célula (Siegel et al., 2004). Tanto a menadiona quanto a hidroquinona podem ser metabolizadas via enzimas de fase II, como a GST, que promove a conjugação da quinona com GSH permitindo sua

eliminação (Watanabe et al., 2004). Por outro lado, se a hidroquinona não for eliminada prontamente, ela pode sofrer autooxidação na presença de O₂ gerando H₂O₂ e quinona (Q) (reação 1). Além disso, a hidroquinona também pode ser oxidada pelo O₂^{•-} formando radical semiquinona (Q^{•-}) e H₂O₂ (reação 2) (Watanabe & Forman, 2003). O radical semiquinona formado na segunda reação pode gerar mais O₂^{•-} e H₂O₂ segundo mecanismos descritos anteriormente.



Observa-se que o produto final do metabolismo da menadiona é o H₂O₂. Apesar da SOD ter papel importante na dismutação do O₂^{•-} formando H₂O₂ e O₂, o estudo de Loor e colaboradores mostrou que a super-expressão tanto da enzima SOD1 quanto da SOD2 de cardiomiócitos parece não melhorar a viabilidade da célula tratada com menadiona. Esse resultado indica que essas enzimas não seriam fatores limitantes para prevenção do estresse induzido por menadiona na célula selvagem. Por outro lado, a super-expressão de catalase diminui significativamente a morte celular, o que indica que o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ contribui significativamente para o efeito tóxico da menadiona (Loor et al., 2010). Um estudo realizado em levedura verificou que a menadiona altera a expressão de genes de forma semelhante à indução por H₂O₂. Ambos agentes estressores induzem a expressão de genes envolvidos na eliminação de H₂O₂ e O₂^{•-} (i.e. SOD e GPx) e aqueles relacionados a reações de oxidação e redução na célula (i.e. tioredoxinas, tioredoxina redutase, glutaredoxina e glutathiona redutase) (Gasch et al., 2000).

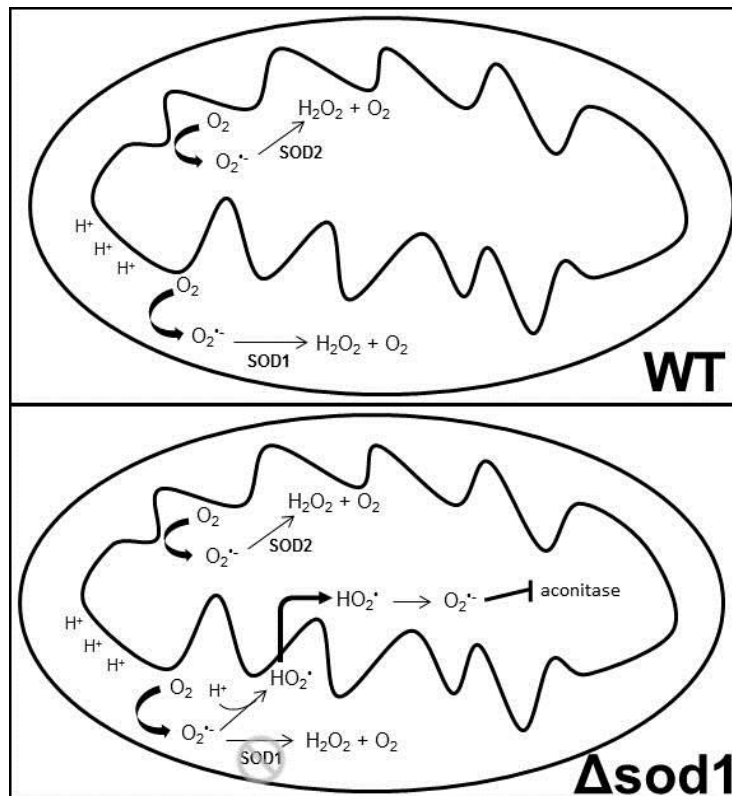
O ensaio de sensibilidade à menadiona realizado com as linhagens selvagem, Δsod2 , Δsod1 e o duplo *knock out* ($\Delta\text{sod1}\Delta\text{sod2}$) indica que a enzima SOD1 da levedura, mais do que a enzima SOD2, tem um papel fundamental na prevenção dos danos oxidativos induzido por menadiona. Sendo assim, a deleção dessa enzima aumenta a sensibilidade da célula à drogas que sofrem ciclo redox, como a menadiona, principalmente devido o aumento de O₂^{•-} dentro da célula. A maior sensibilidade à menadiona observada nas células Δsod1 pode ser explicada em parte pela maior atividade da SOD1 na célula quando comparada a SOD2. Segundo o estudo de Lushchack e colaboradores, as linhagens de EG110 (Δsod2) e EG118 (Δsod1) apresentam, respectivamente, 71% e 2% da atividade SOD total quando comparado com a linhagem selvagem (EG103) (Lushchack et al., 2005). Além disso, a ausência da SOD1 em compartimentos importantes da célula, como no citosol e no espaço

intermembrânico, compromete o sistema de defesa da célula deficiente, principalmente em regiões onde pode ocorrer a produção de EROs promovida pelo ciclo redox da menadiona.

A adição de 15 μM de menadiona promove uma diminuição da capacidade da levedura selvagem em formar novas colônias. Porém, essa concentração de menadiona não altera as concentrações de glutathiona total e GSSG da levedura selvagem, não diminui a atividade da aconitase e nem mesmo promove alteração da permeabilidade da membrana celular. Esses resultados indicam que a adição de 15 μM de menadiona não promove um estresse oxidativo relevante na levedura selvagem. Por outro lado, a adição de 15 μM de menadiona na levedura Δsod1 impede, quase que totalmente, sua capacidade de formar novas colônias e aumenta em aproximadamente 10 vezes a concentração de GSSG. Além disso, essa concentração de menadiona promove a inativação da aconitase (com diminuição de 77% a 87% da atividade aconitase) e a alteração da permeabilidade de membrana. Portanto, o estresse induzido por 15 μM de menadiona ocorreu apenas na linhagem Δsod1 , o que reforça a importância da SOD1 em dismutar o $\text{O}_2^{\cdot-}$ gerado pelo ciclo redox da menadiona.

Os resultados de atividade aconitase mostram que a levedura Δsod1 apresenta aproximadamente um terço da atividade aconitase da levedura selvagem. Essa diminuição na atividade desta enzima devido à deficiência de SOD1 já foi relatada em outros estudos (Gardner & Fridovich, 1991; Wallace et al., 2004). Esse resultado comprova a importância da SOD1 em dismutar o $\text{O}_2^{\cdot-}$ prevenindo o ataque radicalar à enzima aconitase. Apesar da aconitase se localizar na matriz mitocondrial e a SOD1 estar presente no espaço intermembrânico da mitocôndria, a ausência dessa enzima antioxidante diminui significativamente a atividade aconitase da célula. Isso indica que a SOD2, presente na matriz mitocondrial, por si só não é capaz de proteger a aconitase durante o crescimento aeróbico da levedura Δsod1 . Sabe-se que $\text{O}_2^{\cdot-}$ é impermeável à membrana celular, porém sua forma protonada (hidroperóxil - HO_2) se difunde facilmente através da membrana lipídica (Salvador et al., 2001; Wallace et al., 2004). Dentro da mitocôndria, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode ser produzido na matriz mitocondrial ou no espaço intermembrânico através da cadeia transportadora de elétrons (Kowaltowski et al., 2009). O $\text{O}_2^{\cdot-}$ produzido no espaço intermembrânico é facilmente protonado nessa região devido ao pH baixo criado pelo gradiente de prótons produzido pela cadeia transportadora de elétrons. A protonação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ permite sua difusão através da membrana interna e migração para a matriz mitocondrial (Wallace et al., 2004, Salvador et al., 2001). O pH em torno de 7,5 da matriz mitocondrial é maior do que o pKa do HO_2 (pKa =

4,8), portanto, ao atingir a matriz mitocondrial, o hidroperóxido sofre desprotonação favorecendo o aumento de superóxido nesse compartimento celular (Salvador et al., 2001; Wallace et al., 2004). Sendo assim, durante o crescimento aeróbico, a ausência de SOD1 faz com que o superóxido produzido no espaço intermembrânico migre para a matriz mitocondrial o que diminui a eficiência da SOD2 e, conseqüentemente, favorece a inativação da aconitase em levedura $\Delta sod1$ (esquema 5). A inativação da aconitase faz com que o metabolismo aeróbico da célula fique comprometido (Wallace et al., 2004; Gardner et al., 1994). A diminuição no metabolismo aeróbico diminui a produção de energia da célula comprometendo a taxa de crescimento da levedura que é característica da linhagens $\Delta sod1$.



Esquema 5: Hipótese para a diminuição da atividade aconitase em levedura $\Delta sod1$. Durante crescimento aeróbico da levedura selvagem, o $O_2^{\cdot-}$ produzido no espaço intermembrânico e na matriz mitocondrial é dismutado pela SOD1 e SOD2 respectivamente. Porém, na ausência de SOD, a concentração de $O_2^{\cdot-}$ no espaço intermembrânico aumenta. O alto gradiente de prótons produzido pela cadeia transportadora de elétrons protona o superóxido. A forma não carregada do superóxido possibilita sua difusão pela membrana interna da mitocôndria para a matriz mitocondrial, onde sofre desprotonação. O aumento da concentração de $O_2^{\cdot-}$ na matriz mitocondrial favorece a inativação da aconitase em levedura $\Delta sod1$.

Apesar da levedura Δ sod1 ter apresentado alteração de fluidez de membrana após insulto com 15 μ M de menadiona, não foram detectados produtos de oxidação de ergosterol ou de demais compostos lipofílicos nas amostras de levedura ao realizar o método de separação e de detecção por HPLC. Vale ressaltar que a concentração de menadiona (5 ou 15 μ M) utilizada para promover estresse oxidativo na levedura Δ sod1 pode não ter sido suficiente para identificar valores detectáveis de peroxidação lipídica. Por outro lado, o resultado não descarta a possibilidade de haver produtos oxidados que não foram adequadamente detectados na coluna. O uso de espectrometria de massas ajudaria na detecção e caracterização destes produtos, uma vez que permite a elucidação da estrutura molecular dos compostos de interesse. Além disso, mesmo que não haja alteração na quantidade de ergosterol, o tratamento com menadiona pode alterar a distribuição do ergosterol na membrana o que pode interferir na sua permeabilidade. Um estudo realizado em *S. cerevisiae* verificou que a indução do estresse por H_2O_2 , apesar de não diminuir a concentração de ergosterol da membrana, modula a organização desse esterol nos microdomínios da membrana e altera a composição de alguns lipídios (Pedroso et al., 2009). Essas alterações na estrutura da membrana celular fazem com que o H_2O_2 se torne menos permeável à membrana plasmática. A diminuição da permeabilidade do H_2O_2 estaria relacionada com a adaptação da célula ao estresse com H_2O_2 , uma vez que diminuiria sua difusão para dentro da célula (Pedroso et al., 2009).

A pré-incubação com AE melhora a viabilidade celular de ambas as linhagens. Além disso, o AE promove aumento da GSH total em ambas as linhagens e diminui significativamente a concentração de GSSG da levedura Δ sod1 tratada com 15 μ M de menadiona. O aumento de GSH-eq oferecido pelo AE pode ser atribuído a: (1) uma maior síntese de glutathiona na célula; (2) uma diminuição no processo de glutathionilação de proteínas; (3) ou pela reversão das proteínas glutathioniladas.

A síntese de glutathiona envolve duas enzimas: a γ -glutamilcisteína sintetase (GSH1) e a glutathiona sintetase (GSH2) (Lu, 2013). O aumento da atividade dessas enzimas promove o aumento da síntese de glutathiona na célula. Estudos mostram que H_2O_2 induz a transcrição de GSH1 em leveduras via fator de transcrição Yap1 (Carmel-Harel & Storz, 2000). Não se sabe ao certo como o AE poderia agir estimulando a síntese de GSH, porém muitos estudos mostram que polifenóis agem estimulando a transcrição de genes antioxidante via interação

com a região do DNA conhecida como elemento de resposta antioxidante (sigla ARE – do inglês *antioxidant response element*) (Hseu et al., 2012; Stevenson & Hurst, 2007; Hur & Gray, 2011). A indução dessa região promovida por polifenóis leva à transcrição de vários genes que codificam enzimas antioxidantes, dentre elas as relacionadas com a biossíntese de glutatona (Hur & Gray, 2011; Lu, 2013).

A glutatona ocorre em resíduos de cisteína e normalmente promove a inativação da proteína (Ghezzi, 2013). Porém, há casos onde a glutatona promove ativação da proteína e alteração da ligação de fatores de transcrição no DNA (Ghezzi, 2013; Mielal et al., 2008). Sabe-se que o processo de glutatona está aumentado durante o estresse oxidativo, o que faz com que muitas proteínas percam sua função em situação de estresse (Ghezzi, 2013). O ataque radical em resíduos de cisteínas leva à formação de intermediários proteicos que reagem facilmente com grupos tiólicos como a GSH, levando à formação de proteínas glutatona (Mielal et al., 2008). Além disso, derivados oxidados de GSH também reagem com proteínas contribuindo com a formação de proteínas glutatona (Ghezzi, 2013). Portanto, a ação antioxidante do AE levaria a uma menor concentração de espécies reativas na célula e, possivelmente, a uma menor formação de proteínas glutatona. A diminuição do processo de glutatona aumentaria a concentração de glutatona livre, a qual é quantificada pelo método enzimático com DTNB. A reversão da glutatona pode ser catalisada por glutaredoxinas (Grx) e tioredoxinas (Trx) (Grant, 2001; Ghezzi, 2013). As glutaredoxinas utilizam glutatona como substrato redutor enquanto que as tioredoxinas promovem a redução por meio da oxidação das suas sulfidrilas (maiores detalhes vide tópico 2.4.4 da revisão bibliográfica). De acordo com a terceira hipótese supracitada, o AE poderia aumentar os níveis de glutatona total na célula por meio do aumento da expressão de Grx e Trx, o que favoreceria a reversão das proteínas glutatona e liberação da glutatona.

A glutatona possui papel fundamental contra o estresse oxidativo. A glutatona é a molécula tiólica mais abundante na célula que possui capacidade redutora (Deponte, 2013). GSH é doador de elétrons de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase e age em conjunto com as glutaredoxinas reduzindo ligações dissulfeto. Além disso, possui papel importante na detoxificação de xenobióticos e age como sinalizador redox da célula (Deponte, 2013). Além de agir nesse equilíbrio redox da célula, a glutatona é fundamental para a construção dos grupamentos de Fe-S presente em determinadas enzimas (i.e. aconitase) e também pode favorecer a reativação dessas enzimas após sofrerem ataque pelo radical superóxido (Gardner & Fridovich, 1993; Toledano et al., 2007). De acordo com o

resultado de atividade aconitase, a pré-incubação com AE tende a aumentar a atividade desta enzima tanto na levedura selvagem quanto na Δ sod1. Portanto, o aumento de glutathiona na levedura promovida pelo AE não apenas favoreceria o sistema antioxidante da célula, mas também estimularia a síntese e a reativação das enzimas que contém grupamento de Fe-S. O aumento da atividade dessas enzimas permite o funcionamento pleno da célula, o que favorece seu crescimento em meio rico (YPD-ágar).

Muitos estudos verificaram que a adição de menadiona à cultura de células leva à diminuição da concentração de glutathiona e tióis totais da célula (Thor et al., 1982; Duthie & Grant, 1989; Zadzinski et al., 1998; Brown et al., 1991; Lushchack et al., 2009; Adnan et al., 2012). Além disso, também foi relatado um aumento de GSSG (Fernades et al., 2007). Além da menadiona, outras quinonas também promovem depleção de glutathiona total e aumento da concentração de GSSG (Rodriguez et al., 2004). De acordo com os resultados de glutathiona apresentados nesse trabalho, o estresse com 15 μ M de menadiona promove a oxidação de GSH na levedura Δ sod1 sem alterar a concentração de glutathiona total na célula. Diminuição de glutathiona total promovida pela menadiona só é observada na levedura pré-incubada com AE ou DFO. Não se sabe ao certo como o DFO poderia interferir na queda dos níveis de glutathiona da célula. Por outro lado, o aumento de glutathiona total promovido pelo AE pode ajudar na eliminação da menadiona por meio da sua conjugação com GSH. Estudos realizados em células utilizando menadiona verificaram que a depleção de glutathiona está relacionada com o efluxo de menadiona conjugada à glutathiona (Zadzinski et al., 1998; Mauzeroll et al., 2004, Castro et al., 2007). A eliminação de menadiona favorecida pelo aumento de GSH-eq promovido pelo AE pode também explicar a menor concentração de GSSG, uma vez que impede que a menadiona entre no ciclo redox produzindo EROs. Vale ressaltar que a adição de glutathiona ou de N-acetil-cisteína (NAC), que promove aumento de GSH na célula, minimizam os efeitos citotóxico da menadiona em culturas de célula (Loor et al., 2010; Adnan et al., 2012)

O aumento de glutathiona total promovido pelo AE é acompanhado pelo aumento da atividade da GR. Estudos relatam que tanto a síntese quanto a redução de GSSG são regulados pelo fator de transcrição Yap1. A expressão das enzimas GSH1, GSH2 e GR normalmente encontra-se elevada em resposta ao estresse (Grant, 2001). Portanto, em situação de estresse, a célula promove aumento da concentração GSH por meio do aumento da síntese e da reciclagem da glutathiona oxidada (GSSG). O aumento na atividade da GR promovida pelo AE poderia estar associado à menor concentração de GSSG na linhagem

Δ sod1 estressada com menadiona e pré-incubada com AE. A maior atividade GPx observada na levedura Δ sod1 quando comparada à levedura selvagem pode indicar que essa linhagem apresenta uma maior concentração de H_2O_2 e/ou peróxidos orgânicos que precisam ser eliminados por essa enzima. Por outro lado, o tratamento com AE tende a diminuir a atividade GPx nessa linhagem, o que pode indicar que a célula tratada com AE encontra-se em menor situação de estresse, haja vista que, numa situação de menor estresse, não haveria tanta necessidade de manter uma atividade alta da enzima GPx. Apesar de muitos trabalhos mostrarem que o AE aumenta atividade GST das células tratadas com carcinógenos (Barch et al., 1995; Ahn et al., 1996), não foi observado alteração da atividade GST com o tratamento com AE e/ou menadiona.

O tratamento prévio com DFO não ofereceu efeito protetor à célula submetida ao estresse por menadiona (evidenciado tanto pelo resultado de viabilidade quanto pela razão GSSG/GSH-eq). Resultado semelhante com DFO também foi observado em células de cardiomiócitos tratadas com menadiona. A adição de 100 μ M de DFO na cultura de células antes e durante o insulto realizado com 25 μ M de menadiona também não conferiu efeito protetor à célula (Loor et al., 2010). Sabe-se que o $O_2^{\cdot -}$ produzido no ciclo redox da menadiona pode reagir com os grupamentos Fe-S de proteínas levando a liberação do ferro da estrutura protéica. O aumento de ferro livre na célula leva à formação de radical hidroxil via reação de Fenton, sendo assim, o uso de um quelante de ferro poderia oferecer efeito protetor contra o estresse oxidativo promovido pela menadiona. Todavia, os resultados obtidos com DFO revelam que o uso de um quelante de ferro não ofereceu efeito protetor significativo contra o estresse oxidativo promovido por 15 μ M de menadiona. Isso pode indicar que o ferro liberado da estrutura de proteínas não possui participação relevante na produção de radicais livres na célula. O estudo de De Freitas e colaboradores realizado com as mesmas linhagens de levedura (EG103 e EG118) também questiona o efeito tóxico do ferro liberado dos grupamentos Fe-S na produção de EROs. Tal questionamento foi embasado no efeito benéfico atribuído à suplementação de ferro em leveduras Δ sod1. A adição cloreto férrico (0,3 e 1mM) no meio de cultura YPG (yeast-peptone-glycerol) melhora o crescimento da linhagem Δ sod1. Além disso, esse estudo também verificou que a linhagem Δ sod1 possui maior transcrição do gene FET3 (que compõe o sistema de transporte de ferro de levedura) (De Freitas et al., 2000). Esse resultado indica que a levedura Δ sod1 apresenta maior necessidade de ferro para o reparo e/ou reconstrução de novos grupamentos de Fe-S o que contribui com o aumento intracelular de ferro observado nessa linhagem. Portanto, acredita-

se que o ferro liberado da estrutura dos grupamentos Fe-S fica, de alguma forma, indisponível para participar da reação de Fenton.

Outra explicação para a ineficiência do uso de um quelante está na sua localização dentro da célula. Enzimas como a aconitase, que são alvos do radical superóxidos, se localizam dentro da mitocôndria. Em contrapartida, o DFO, quando captado pela levedura, é estocado no vacúolo da célula (Philpott & Protchenko, 2008). Sendo assim, o DFO não é capaz de quelar o ferro liberado da estrutura protéica, uma vez que não se encontra no mesmo compartimento onde há ferro quelável. Mesmo questionamento também pode ser atribuído ao AE, uma vez que não há estudos mostrando localização celular desse polifenol que corroborariam com um possível mecanismo quelante.

O conjunto de resultados apresentados nesse trabalho mostra que o AE possui a capacidade de modular a atividade de algumas enzimas antioxidantes e também promove o aumento de glutathiona total na célula, prevenindo o estresse promovido pela menadiona. O AE é conhecido por possuir efeito antimutagênico e anticarcinogênico contra uma variedade de carcinógenos, incluindo nitrosaminas, micotoxinas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Ayrton et al., 1992). Esse efeito protetor do AE é normalmente atribuído à sua capacidade de inibir enzimas responsáveis pela bioativação de carcinógenos, como as da família do citocromo P450 e por induzir a expressão de NQO1 e GST que levam à detoxificação do carcinógeno (Zhang et al., 1993; Barch et al., 1994; Barch et al., 1995; Barch et al., 1996, Ahn et al., 1996). Muitos estudos que administraram AE em células e em cobaias também verificaram que o AE promove aumento de GSH e da atividade de enzimas antioxidantes tais como GR, GPx, catalase e SOD (Teel, 1986; Akagi et al., 1995; Khanduja et al., 1999; Atessahín et al., 2007; Devipriya et al., 2007; Kannan & Quine, 2012). Estudo realizado em células de queratinócitos humano demonstrou que o AE estimula a expressão de genes antioxidantes e do fator de transcrição Nrf-2 protegendo a célula contra a radiação UVA (Hseu et al., 2012). Além disso, o mesmo estudo verificou que o AE não apresenta efeito protetor em células com RNA de Nrf-2 silenciada (Hseu et al., 2012). O Nrf-2 é um fator de transcrição presente em animais e humanos que se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) do DNA estimulando a transcrição de genes antioxidantes (papel equivalente ao Yap-1 em leveduras). Esse resultado demonstra que o AE age via Nrf-2 estimulando a transcrição de enzimas antioxidantes, o que explicaria o aumento de GSH e da atividade de enzimas antioxidantes observados nos diversos estudos da literatura.

Apesar de muitos estudos mostrarem que o AE apresenta efeito citoprotetor e anticarcinogênico, uma série de estudos desenvolvidos por Labieniec e colaboradores revelam que o AE apresenta efeito tanto antioxidante quanto pró-oxidante em células submetidas ou não ao estresse por Cu^{2+} ou H_2O_2 (Labieniec et al., 2003; Labieniec & Gabryelak, 2005; Labieniec & Gabryelak, 2007). O efeito antioxidante ou pró-oxidante depende da concentração do polifenol no meio. A presença de 1 até 5 μM de AE diminui danos oxidativos em DNA em células tratadas com Cu^{2+} ou H_2O_2 . No entanto, a adição de concentrações maiores (5 a 240 μM) de AE promove lesões no DNA (Labieniec et al., 2003; Labieniec & Gabryelak, 2005). Além de causar danos no DNA, a adição de concentrações maiores de AE (até 500 μM) também promove, de forma dose dependente, diminuição da viabilidade celular e de tióis totais e aumento de proteínas carboniladas (Labieniec & Gabryelak, 2005; Labieniec & Gabryelak, 2007).

Uma das explicações para o efeito do AE em induzir a transcrição de genes antioxidantes está relacionada com seu metabolismo. O AE, assim como outros polifenóis, é metabolizado como um xenobiótico. Portanto, sofre redução via P450 produzindo compostos intermediários (radical semiquinona) que levam à formação de EROs (Stevenson & Hurst, 2007; Hur & Gray, 2011). A metabolização via P450 gera $\text{O}_2^{\cdot-}$ que é dismutado espontaneamente ou sofre dismutação catalisada pela SOD formando H_2O_2 . O aumento de H_2O_2 na levedura leva à oxidação do fator de transcrição Yap1 que migra para o núcleo e ativa a expressão de genes antioxidantes via interação com a região ARE do DNA (para maiores detalhes, vide tópico 2.5 da revisão bibliográfica). Segundo o mecanismo de ação proposto acima para os polifenóis, o AE previne o estresse oxidativo por meio de uma ação pró-oxidante que estimula o sistema antioxidante endógeno. Portanto, o efeito antioxidante ou pró-oxidante do polifenol dentro da célula irá depender do equilíbrio final entre a geração de EROs produzidas durante sua metabolização e a eficiência do sistema antioxidante endógeno, que também pode ser estimulado pelo polifenol. Vale ressaltar que as células tratadas com 50 μM de AE não apresentaram quaisquer indicadores de aumento de estresse oxidativo. Portanto, a ação pró-oxidante sugerida para o AE não apresentaria efeito deletério à célula, mas seria suficiente para induzir o sistema antioxidante endógeno da levedura. Apesar dos resultados mostrarem que o AE modula a atividade de enzimas antioxidantes, o presente trabalho não verificou a expressão de genes antioxidantes ou mesmo a importância do fator de transcrição Yap-1 no mecanismo de ação do AE. Portanto, mais estudos devem ser conduzidos de modo a auxiliar na compreensão do mecanismo pelo qual o AE estaria

agindo na levedura deficiente em SOD1, protegendo-a contra os efeitos tóxicos da menadiona.

6 - Conclusão

O presente trabalho mostrou que o AE apresenta uma boa capacidade quelante de ferro impedindo a participação do íon metálico nas reações geradoras de EROs. No entanto, o estudo realizado em levedura selvagem e deficiente em SOD1 submetidas ao estresse com menadiona revelou que o mecanismo protetor do AE estaria relacionado principalmente à sua capacidade de ativar o sistema antioxidante da célula. Em especial, evidenciou-se aumento de glutatona total após pré-incubação com AE o que auxiliaria no equilíbrio redox da célula permitindo maior viabilidade da célula submetida ao estresse com menadiona.

7 - Considerações finais

O AE é o principal constituinte fenólico de frutas vermelhas e romã (Häkkinen et al., 2000, Cerdá et al, 2004). Além disso, também está presente em uvas e castanhas (Lee et al, 2005; Daniel *et. al.*, 1989). O AE é encontrado nos alimentos na forma livre, geralmente ligado à glicosídeos, ou como componente de elagitaninos. A concentração de AE nas fontes alimentares atinge a faixa milimolar (Daniel *et. al.*, 1989). Estudos sobre biodisponibilidade do AE mostram que parte do AE livre é absorvida no estômago ou na porção proximal do intestino delgado (Lei et al., 2003;). Porém, grande parte do AE que atinge a porção final do intestino delgado e do cólon é metabolizada pela microbiota produzindo urolitina A e urolitina B. Apenas uma pequena parte do AE consumido e das urolitinas A e B produzidas pela microbiota é absorvida pelo organismo. Estudo realizado em humanos verificou uma baixa concentração plasmática de AE e urolitinas A e B após consumo de suco de romã contendo 318 mg de elagitaninos e 12 mg de AE livre. A máxima concentração de AE (0,06 $\mu\text{mol/L}$) foi observada após 1h de ingestão, enquanto que a máxima concentração de urolitinas A e B (0,14 e 0,01 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente) foi encontrada após 6h de ingestão do suco (Seeram el al., 2006). Após ser absorvido, tanto o AE quanto as urolitinas são rapidamente metabolizadas por enzimas de fase II onde sofrem conjugação com grupos metil, glucuronil e sulfidril (Seeram el al., 2006; Cerdá et al., 2004). Um estudo a respeito da distribuição do AE no organismo demonstrou que a maior concentração de AE é encontrada

no fígado e no rim de ratos após injeção intraperitoneal de ^3H -ácido elágico ($[^3\text{H}]\text{-AE}$). Além disso, verifica-se alta concentração de $[^3\text{H}]\text{-AE}$ na bile após 60 minutos e na urina após 120 minutos da administração intraperitoneal (Teel, 1987). Esse resultado demonstra que após atingir a corrente sanguínea, o AE é transportado para o fígado onde será metabolizado e, em seguida, os metabólitos são excretados na urina e na bile. Diferentes metabólitos glucuronilados foram identificados no plasma e na urina de voluntários após terem consumido alimento fonte de AE (Seeram et al., 2006; Cerdá et al., 2004).

Portanto, observa-se que apesar de ser muito abundante na dieta humana, apenas uma pequena concentração de AE que seria ativo é encontrado na corrente sanguínea. Porém, a baixa absorção, a alta metabolização e a rápida eliminação desse polifenol não impedem que ele apresente efeitos benéficos ao organismo. Acredita-se, que tanto o efeito antioxidante direto do AE quanto o seu efeito modulador da atividade de enzimas antioxidantes possam contribuir com seu efeito benéfico após o consumo de alimentos fonte. A alta concentração de AE no trato gastrointestinal permite que esse polifenol seja ali um eficiente antioxidante, agindo tanto como sequestrador de radicais livres quanto quelante de íons metálicos. Segundo Halliwell (2007), o trato gastrointestinal é constantemente exposto a espécies reativas. Sabe-se que muitos produtos oxidados são produzidos durante o armazenamento e a cocção do alimento (Doureradjou & Koner, 2008). Além disso, dietas ricas em ferro, característico dos povos ocidentais, promove aumento da excreção de ferro pelas fezes, o que pode causar danos oxidativos no cólon e reto. De fato, estudos mostram uma correlação direta entre o consumo de carnes vermelhas e a incidência de câncer de cólon de intestino (Chan et al., 2011). Sendo assim, não só o AE, mas também outros polifenóis seriam os principais componentes da dieta presentes no trato gastrointestinal capazes de quelar o ferro excedente (Halliwell, 2007).

A baixa concentração de AE dentro do organismo faz com que ele possa agir induzindo a expressão de enzimas antioxidantes sem promover um estresse importante. Além disso, o metabolismo do AE por enzimas de fase II parece não envolver a conjugação com GSH, o que pode contribuir para uma maior manutenção do estoque de glutathiona na célula. Ainda não se sabe ao certo como o AE leva à indução da transcrição de genes antioxidantes. Estudos mostram comportamentos distintos com a administração de AE *in vivo* ou mesmo em cultura de células. Tanto o efeito antioxidante quanto o pró-oxidante já foram relatados. Além disso, o AE apresenta outros mecanismos de ação que não se limitam apenas à modulação de genes de enzimas antioxidantes. Estudos que administraram AE ou seus derivados em células

cancerosas verificaram ação anti-proliferativa, pro-apoptótica e anti-angiogênica (Herber, 2008; Matthew et al., 2008). O AE também pode atuar inibindo a ativação do fator de transcrição NF- κ B (Herber, 2008; Matthew et al., 2008). A ativação de NF- κ B estimula a atividade imune, inflamatória e proliferativa na maioria dos tipos de célula (Yamamoto & Gaynor, 2001). Não se sabe ao certo como o AE inibe a ação do NF- κ B, mas múltiplos mecanismos podem estar envolvidos na sua ação. O efeito observado depende da condição experimental como, por exemplo, da concentração de AE, do tipo de célula, do agente estressor utilizado, do desenho experimental, dentre outros. Neste sentido, o presente estudo colabora para um melhor entendimento do mecanismo de ação do AE dentro da célula e serve de base para outros trabalhos que envolvem o estudo do efeito de elagitaninos no organismo.

8 – Referências bibliográficas

Adnan, H.; Antenos, M.; Kirby, G.M. **The effect of menadione on glutathione S-transferase A1 (GSTA1): c-Jun N-terminal kinase (JNK) complex dissociation in human colonic adenocarcinoma Caco-2 cells.** *Toxicology Letters* 214: 53– 62, 2012.

Ahn, D.; Putt, D.; Kresty, L.; Stoner, G.D.; Fromm, D.; Hollenberg, P.F. **The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes P450 and phase II enzymes.** *Carcinogenesis* 17 (4): 821-828, 1996.

Andrade Jr, R.G.; Dalvi, L.T.; Silva Jr, J.M.C.; Lopes, G.K.B.; Alonso, A.; Hermes-Lima, M. **The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 1–9, 2005.

Andrade, R.G. ; Ginani, J.S.; Lopes, G.K.; Dutra, F.; Alonso, A.; Hermes-Lima, M. **Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation.** *Biochimie* 88: 1287-1296, 2006.

Andreadi, C. K.; Howells, L. M.; Atherfold, P. A.; Manson, M.M. **Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemoxygenase-1 by dietary polyphenols.** *Mol. Pharmacol.* 69:1033–1040; 2006.

Ateşşahin, A.; Ceribaşı, A.O.; Yuce, A.; Bulmus, O.; Cikim, G. **Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 100(2):121-6, 2007.

Ayrton, A.D.; Lewis, D.F.V.; Walker, R.; Ioannides, C. **Antimutagenicity of ellagic acid towards the food mutagen IQ: investigation into possible mechanisms of action.** *Fd Chem. Toxic.*, 30 (4) 289-295, 1992.

Bachhawat, A.K.; Thakura, A.; Kaur, J. **Glutathione transporters.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (2013) 3154–3164.

Barch, D.H.; Rundhaugen, L.M.; Pillay, N.S. **Ellagic acid induces transcription of the rat Glutathione S-Transferase-YA gene.** *Carcinogenesis* 16 (3): 665-668, 1995.

Barch, D.H.; Rundhaugen, L.M.; Stoner, G.D.; Pillay, N.S.; Rosche, W.A. **Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid.** *Carcinogenesis* 17 (2): 265-269, 1996.

Barch, D.H.; Rundhaugen, L.M.; Thomas, P.E.; Kardos, P. **Dietary ellagic acid inhibits the enzymatic activity of CYP1A1 without altering hepatic concentrations of CYP1A1 or CYP1A1 mRNA.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 201 (3): 1477-82, 1994.

Bock, P.E.; Srinivasan, K.R.; Shore, J.D. **Activation of intrinsic blood coagulation by ellagic acid: Insoluble ellagic acid-metal ion complexes are the activating species.** *Biochemistry*, 20: 7258-7266, 1981.

Bocking, T.; Barrow, K.D.; Netting, A.G.; Chilcott, T.C.; Coster, H.G.L.; Hofer, M. **Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eur. J. Biochem.* 267, 1607-1618, 2000.

- Bradford, M.M. **Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**, *Anal. Biochem.* **72**: 248–254, 1976.
- Breen, A.P.; Murphy, J.A. **Reactions of oxyl radicals with DNA**. *Free Radical Biology & Medicine*, **18** (6): 1033-1077, 1995.
- Brown, P.C.; Dulik, D.M.; Jones, T.W. **The toxicity of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) and two thioether conjugates studied with isolated renal epithelial cells**. *Arch Biochem Biophys.* **285**(1):187-96, 1991.
- Cadenas, E.; Davies, K.J.A. **Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging**. *Free Radical Biology & Medicine*, **29** (3-4): 222–230, 2000.
- Carlberg, I.; Mannervik, B. **Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver**. *J. Biol. Chem.*, 1975; **250**: 5475-5480.
- Carlberg, C.; Mannervik, B. **Glutathione reductase**. *Methods in Enzymology* v.113, p.488-495, 1985.
- Carmel-Harel, O; Storz, G. **Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress**. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:439–61, 2000.
- Castro, L.; Rodriguez, M.; Radi, R. **Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxid**. *J. Biol. Chem.* **269**(47), 29409-29415, 1994.
- Castro, F.A.V.; Herdeiro, R.S.; Panek, A.D.; Eleutherio, E.C.A.; Pereira, M.D. **Menadione stress in *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in the glutathione transferases**. *Biochimica et Biophysica Acta* **1770** :213–220, 2007.
- Cerdá, B.; Llorach, R.; Cerón, J.J.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. **Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice**. *Eur J Nutr*, **42** : 18–28, 2003.
- Cerdá, B.; Espín, J.C.; Parra, S.; Martínez, P.; Tomás-Barberán, F.A. **The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans**. *Eur J Nutr*, **43** : 205–220, 2004.
- Cerdá B, Periago P, Espín JC, Tomás-Barberán FA. **Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds**. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 5571-5576, 2005.
- Chung, K.T.; Wong, T.Y.; Wei, C.; Huang, Y.W.; Lin, Y. **Tannins and Human Health: A Review**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **38**(6): 421–464, 1998.
- Corson, L.B.; Folmer, J.; Strain, J.J.; Culotta, V.C.; Cleveland, D.W. **Oxidative stress and iron are implicated in fragmenting vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae* lacking Cu,Zn-superoxide dismutase**. *J Biol Chem*, **274**(39):27590-27596, 1999.
- Cortés-Rojo, C. et al. **Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content**. *J Bioenerg Biomembr* **41**:15–28, 2009.

Criddle, D.N. et al. **Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells.** *The Journal of Biological Chemistry* 281(52), 40485–40492, 2006.

Dalvi LT. **Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*)** [dissertação de mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília (UnB). Programa de pós-graduação em Nutrição Humana; 2008.

Daniel, EM; Krupnicka, AS; Heura YH, Blinzlera, JA; Nimsb, RW; Stoner, GD. **Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts.** *J. Food Comp. Anal.* 2, 338-349, 1989.

Deponte, M. **Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (2013) 3217–3266.

De Freitas, J.M.; Liba, A.; Meneghini, R.; Valentine, J.S.; Gralla, E.B. **Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism.** *J Biol Chem*, 275(16):11645-11649, 2000.

Devipriya, N.; Sudheer, A.R.; Menon, V.P. **Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats.** *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21: 621–630, 2007.

Díaz, M.; Herrero, M.; García, L.A.; Quirós, C. **Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses.** *Biochemical Engineering Journal*, 48: 385-407, 2010.

Doureradjou, P.; Koner, B.C. **Effect of different cooking vessels on heat induced lipid peroxidation of different edible oils.** *Journal of Food Biochemistry* 32:740-751, 2008.

Drechsel, D.A.; Patel, M. **Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease.** *Free Radical Biology & Medicine* 44 (2008) 1873–1886.

Dupont, S.; Lemetais, G.; Ferreira, T.; Cayot, P.; Gervais, P.; Beney, L. **Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?** *Evolution* 66-9: 2961–2968, 2012.

Duthie, S.J.; Grant, M.H.. **The toxicity of menadione and mitozantrone in human liver-derived Hep G2 hepatoma cells.** *Biochemical Pharmacology* 38(8):1247-1255, 1989.

Fang, Y.Z.; Yang, S.; Wu, G. **Free radicals, antioxidants, and nutrition.** *Nutrition* 18: 872–879, 2002.

Fenton HJH. **The oxidation of tartaric acid in presence of iron.** *J Chem Soc Proc* 10: 157–158, 1894.

Ferguson, L.R. **Role of plant polyphenols in genomic stability.** *Mutation Research* 475: 89–111, 2001.

Fernandes, P.N.; Mannarino S.C.; Silva, C.G.; Pereira, M.D.; Panek, A.D.; Eleutherio, E.C.A.. **Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Redox Report* 12:236-244, 2007.

- Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. **Iron toxicity and antioxidant nutrients.** *Toxicology* 180: 23-32, 2002.
- Frei, B.; Higdon, J.V. **Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies.** *J. Nutr.*, 133: 3275S–3284S, 2003.
- Fong, K.L.; McCay, P.B.; Poyer, J.L. **Evidence for superoxide-dependent reduction of Fe³⁺ and its role in enzyme-generated hydroxyl radical formation.** *Chem Biol Interact.* 15(1):77-89, 1976.
- Gaetke, L.M.; Chow, C.K. **Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients.** *Toxicology* 189: 147-163, 2003.
- Gardner, P.R. **Superoxide-driven aconitase Fe-S center cycling.** *Bioscience Reports* 17(1), 33-42, 1997.
- Gardner, P.R. **Aconitase: sensitive target and measure of superoxide.** *Methods Enzymol.* 2002;349:9-23.
- Gardner, P.R.; Fridovich, I. **Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase.** *J. Biol. Chem.* 266(29):19328-19333, 1991.
- Gardner, P.R.; Fridovich, I. **Effect of glutathione on aconitase in Escherichia coli.** *Arch Biochem Biophys.* 15;301(1):98-102, 1993.
- Gardner, P.R.; Nguyen, D.D.H.; White, C.W. **Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and rat lungs.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 12248-12252, 1994.
- Gasch, A.P. et al. **Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes.** *Molecular Biology of the Cell* 11, 4241–4257, 2000.
- Ghezzi, P. **Protein glutathionylation in health and disease.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1830:3165–3172, 2013.
- Ginani, J. **Estudo da ação antioxidante *in vitro* do polifenol ácido elágico.** [dissertação de mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília (UnB). Programa de pós-graduação em Nutrição Humana; 2005.
- Gralla, E.B.; Valentine, J.S. **Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn Superoxide Dismutase: Characterization and spontaneous mutation rates.** *J. Bacteriol.* 173 (18) 5918-5920, 1991.
- Grant, C.M. **Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions.** *Molecular Microbiology* 39(3), 533-541, 2001.
- Griffith, O.W. **Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine.** *Anal Biochem.* 15;106(1):207-12, 1980.
- Gutteridge, J.M.C. **Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates.** *FEBS Letters* 128 (2): 343-346, 1981.

Halliwell, B. **Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems?** *FEBS Lett* 92(2):321-6, 1978a.

Halliwell, B. **Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Its role in degradation of hyaluronic acid by a superoxide-generating system.** *FEBS Lett* 96(2):238-242, 1978b.

Halliwell, B & Gutteridge, JMC. **Free radicals in biology and medicine.** 4.ed. Londres: Oxford Press, 2007.

Halliwell, B. **Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?** *Cardiovascular Research* 73: 341–347, 2007.

Halliwell, B. **Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life.** *Plant Physiology*, 141: 312–322, 2006.

Hermes-Lima, M.; Ponka, P.; Schulman, H.M. **The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate.** *Biochim Biophys Acta.* 1523(2-3): 154-160, 2000.

Hermes-Lima, M.; Gonçalves, M.S.; Andrade Jr, R.G. **Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) prevents copper-mediated free radical formation.** *Mol. Cell. Biochem.* 228: 73-82, 2001.

Hermes-Lima, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals.** In: Functional Metabolism: Regulation and adaptation. Cap. 12, pp.319-368, Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2004a.

Hermes-Lima, M. **Oxidative stress and medical sciences.** In: Functional Metabolism: Regulation and adaptation. Cap. 13, pp.369-382, Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2004b.

Herrero, E.; Ros, J.; Bellí, G.; Cabisco, E. **Redox control and oxidative stress in yeast cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1780: 1217-1235, 2008.

Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B.; Kromhout, D. **Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study.** *Lancet* 342: 1007-1011, 1993.

Hseu, Y.C., et al. **Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the Ho-1 and Nrf-2 antioxidant genes.** *Food and Chemical Toxicology* 50:1245-1255, 2012.

Huetz, P.; Mavaddat, N.; Mavri, J. **Reaction between Ellagic Acid and an Ultimate Carcinogen.** *J. Chem. Inf. Model.*, 45 (6): 1564-1570, 2005.

Hur, W.; Gray, N.S. **Small molecule modulators of antioxidant response pathway.** *Current Opinion in Chemical Biology* 15:162–173, 2011.

Imlay, J.A. **Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen.** *Molecular Microbiology* 59 (4), 1073–1082, 2006.

Jaén, J.A.; González, L.; Vargas, A.; Olave, G. **Gallic acid, ellagic acid and pyrogallol reaction with metallic iron.** *Hyperfine Interactions* 148/149: 227-235, 2003.

- Jakobs, S.; Fridrich, D.; Hofem, S.; Pahlke, G.; Eisenbrand, G. **Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase.** *Mol. Nutr. Food Res.* 50:52–57; 2006.
- Kakhlon, O.; Cabantchik, Z.I. **The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes.** *Free Radic. Biol. Med.* 33: 1037-1046, 2002.
- Kannan, M.M.; Quine, S.D. **Ellagic acid ameliorates isoproterenol induced oxidative stress: Evidence from electrocardiological, biochemical and histological study.** *Eur. J. Pharmacol.* 659:45-52, 2011.
- Kannan, M.M.; Quine, S.D. **Ellagic acid protects mitochondria from β -adrenergic agonist induced myocardial damage in rats; evidence from *in vivo*, *in vitro* and ultra structural study.** *Food Research International*, 45:1-8, 2012.
- Kaplan, C.D.; Kaplan, J. **Iron acquisition and transcriptional regulation.** *Chem. Rev.* 109, 4536-4552, 2009.
- Khanduja, K.L.; Gandhi, R.K.; Pathania, V.; Syal, N. **Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice.** *Food and Chemical Toxicology* 37: 313-318, 1999.
- Kowaltowski, A.J.; de Souza-Pinto, N.C.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E. **Mitochondria and reactive oxygen species.** *Free Radic Biol Med.* 47(4):333-43, 2009.
- Labieniec, M.; Gabryelak, T. **Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H_2O_2 or Cu^{2+} ions.** *Toxicology in Vitro* (21): 146–156, 2007.
- Labieniec, M.; Gabryelak, T. **Measurement of DNA damage and protein oxidation after the incubation of B14 Chinese hamster cells with chosen polyphenols.** *Toxicology Letters*, (155): 15–25, 2005.
- Labieniec, M.; Gabryelak, T.; Falcioni, G. **Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*.** *Mutation Research*, (539): 19–28, 2003.
- Lawrence, R.A.; Burk, R.F. **Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver.** *Biochem Biophys Res Commun.* 23;71(4):952-8, 1976.
- Lee, J.; Godon, C.; Lagniel, G.; Spector, D; Garin, J.; Labarre, J.; Toledano, M.B. **Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast.** *J. Biol. Chem.*, 274(23):16040-16046, 1999.
- Lei, F.; Xing, D.M.; Xiang, L.; Zhao, Y.N.; Wang, W.; Zhang, L.J.; Du, L.J. **Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract.** *Journal of Chromatography B*, 796: 189–194, 2003.
- Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W., Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.** *Methods Enzymol.* 186: 464-478, 1990.
- Liu, C.; Zhou, J.; Li, Q.; Wang, L.; Liao, Z.; Xu, H. **DNA damage by copper(II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 75: 233–240, 1999.

Liu, Simin; Manson, JoAnn E; Lee, I-Min; Cole, Stephen R.; Hennekens, Charles H.; Willett, Walter C.; Buring, Julie E. **Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study.** *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 72, 922-928.

Lloyd, D.R.; Phillips, D.H. **Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links.** *Mutation Research*, 424: 23–36, 1999.

Loarca-Pina, G.; Kuzmicky, P.A.; De Mejia, E.G.; Kado, N.Y. **Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B1 in the Salmonella microsuspension assay.** *Mutat. Res.* 398(1–2), 183–187, 1998.

Longo, V.D.; Gralla, E.B.; Valentine, J.S. **Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae* - Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo.** *J Biol Chem*, 271(21):12275-12280, 1996.

Loor, G. et al. **Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis.** *Free Radical Biology & Medicine* 49 (2010) 1925–1936.

Lopes, G.K.B.; Schulman, H.M.; Hermes-Lima, M. **Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions.** *Biochem.and Biophys Acta.* 1472: 142-152, 1999.

Lotito, S.B; Frei, B. **Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?** *Free Radical Biology & Medicine* 41: 1727–1746, 2006.

Lu, S.C. **Glutathione synthesis.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3143–3153, 2013.

Lushchak, V.; Semchyshyn, H.; Mandryk, S.; Lushchak, O. **Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 441 (2005) 35–40.

Lushchak, O.V.; Bayliak, M.M.; Korobova, O.V.; Levine, R.L.; Lushchak, V.I. **Buffer modulation of menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Redox Rep.* 14(5):214-20, 2009.

Lushchak, V.I. **Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals.** *Comp. Biochem. Physiol. C*, 153:175-190, 2011.

Lushchak, V.I. **Oxidative stress in yeast.** *Biochemistry (Moscow)*, 75(3):281-296, 2010.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *Am J Nutr.*79: 727-47, 2004.

Marí, M.; Morales, A.; Colell, A.; García-Ruiz, C.; Kaplowitz, N.; Fernández-Checa, J.C. **Mitochondrial glutathione: Features, regulation and role in disease.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (2013) 3317–3328.

Maringanti, S.; Imlay, J. **An intracellular iron chelator pleiotropically suppresses enzymatic and growth defects of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*.** *J. Bacteriol.* 181(12): 3792-3802, 1999.

- Marnett, L.J. **Oxyl radicals and DNA damage.** *Carcinogenesis*, 21 (3): 361-370, 2000.
- Maurice, R.; Jean, D.; Claude, C.; J. A, B. D., **Chimie des Solutions**, Technique et Documentation, Paris, 1990.
- Mauricio, A.Q.; Lopes, G.K.; Gomes, C.S.; Oliveira, R.G.; Alonso, A.; Hermes-Lima, M. **Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits iron-induced ascorbate oxidation and ascorbyl radical formation.** *Biochim. Biophys. Acta* 1620:15-24, 2003.
- Mauzeroll, J.; Bard, A.J.; Owhadian, O.; Monks, T.J. **Menadione metabolism to thiodione in hepatoblastoma by scanning electrochemical microscopy.** *PNAS*, 101(51):17582–17587, 2004.
- McCord, J.M.; Day, E.D. **Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex.** *FEBS Lett*, 86(1): 139-142, 1978.
- Meneghini, R. **Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage.** *Free Radical Biology & Medicine*, 23 (5): 783–792, 1997.
- Mieyal, J.J.; Gallogly, M.M.; Qanungo, S.; Sabens, E.A.; Shelton, M.D. **Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation.** *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(11): 1941-88, 2008.
- Moon, Y.J.; Wang, X.; Morris, M.E. **Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism.** *Toxicol In Vitro* 20(2):187-210, 2006.
- Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Padeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P.; Cillard, J. **Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures.** *Biochemical Pharmacology* 45(1) 13-19, 1993.
- Morgan, B; Ezerina, D; Amoako, T.N.E., Riemer, J.; Seedorf, M.; Dick, T.P. **Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis.** *Nature Chemical Biology* 9: 119–125, 2013.
- Muller, E.G. **A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth.** *Mol. Biol. Cell* 7:1805-1813, 1996.
- Nguyen, T.; Sherratt, P.J.; Pickett, C.B. **Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:233–60, 2003.
- Nishino, T.; Okamoto, K. **The role of the [2Fe–2S] cluster centers in xanthine oxidoreductase.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 82: 43–49, 2000.
- Oliver, J.D. **The Viable but Nonculturable State in Bacteria.** *The Journal of Microbiology* 43(S) 93-100, 2005.
- Oikawa, S.; Kawanishi, S. **Distinct mechanisms of site-specific DNA damage induced by endogenous reductants in the presence of iron(III) and copper(II).** *Biochimica et Biophysica Acta* 1399: 19-30, 1998.
- Paglia, D.E.; Valentine, W.N. **Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.** *J. Lab. Clin. Med.* 70(1):158-69, 1967.

- Pardo-Andreu, G.L.; Delgado, R.; Nunez-Selles, A.J.; Vercesi, A.E. **Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation.** *Pharmacological Res.* 53:253-260, 2006.
- Pedroso, N. et al. **Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Free Radical Biology & Medicine* 46 (2009) 289–298.
- Perron, N.R.; Brumaghim, J.L. **A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding.** *Cell Biochem. Biophys.* 53:75–100, 2009.
- Petrat, F.; De Groot, H.; Rauen, U. **Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 376(1): 74–81, 2000.
- Petrat, F.; De Groot, H.; Rauen, U. **Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells.** *Biochem. J.* 356:61-69, 2001.
- Philpott, C.C.; Protchenko, O. **Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eukaryotic Cell*, 7(1): 20-27, 2008.
- Prior, R.L. **Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage.** *Am J Clin Nutr* 78(suppl):570S–8S, 2003.
- Priyadarsini, K.I.; Khopde, S.M.; Kumar, S.S.; Mohan, H. **Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant.** *J Agric. Food Chem.* 50: 2200-2206, 2002.
- Przewloka, S.R.; Shearer, B.J. **The further chemistry of ellagic acid II. Ellagic acid and water-soluble ellagates as metal precipitants.** *Holzforschung*, 56: 13-19, 2002.
- Reinke, L.A.; Moore, D.R.; Rau, J.M.; McCay, P.B. **Inorganic phosphate promotes redox cycling of iron in liver microsomes: effects on free radical reactions.** *Arch. Biochem. Biophys.* 316:758-764, 1995.
- Reznick, A.Z., Packer, L. **Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay.** *Methods Enzymol.* 233: 357-363, 1994.
- Rodriguez, C.E.; Shinyashiki, M.; Froines, J.; Yu, R.C.; Fukuto, J.M.; Choa, A.K. **An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system.** *Toxicology* 201:185–196, 2004.
- Salma, M.; Rousseaux, S.; Sequeira-Le Grand, A.; Divol, B.; Alexandre, H. **Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*.** *PLoS ONE* 8(10): e77600, 2013.
- Salvador, A.; Sousa, J.; Pinto, R.E. **Hydroperoxyl, superoxide and pH gradients in the mitochondrial matrix: a theoretical assessment.** *Free Radical Biology & Medicine* 31(10), 1208–1215, 2001.
- Santos, P.R.; Genaro-Mattos, T.C.; Monteiro, A.M.; Miyamoto, S.; Figueiredo Neto, A.M. **Behavior of the thermal diffusivity of native and oxidized human low-density lipoprotein solutions studied by the Z-scan technique.** *J Biomed Opt.* 17(10):105003, 2012.

Savin, T.Z.; Balmori, Y.S. **Daño a Lípidos**. In: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. México: Editorial El Manual Moderno, 2008. p135-146.

Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C.; Rémésy, C. **Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health**. *Biomed Pharmacother* 56 (2002) 276–282

Seeram, N.P.; Lee, R.; Heber, D. **Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice**. *Clinica Chimica Acta* 348: 63–68, 2004.

Seeram, N.P.; Henning, S.M.; Zhang, Y.; Suchard, M.; Li, Z.; Heber, D. **Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours**. *J. Nutr.* 136: 2481–2485, 2006.

Sehati, S.; Clement, M.H.S.; Martins, J; Xu, L.; Longo, V.D.; Valentine, J.S.; Gralla, E.B. **Metabolic alterations in yeast lacking copper-zinc superoxide dismutase**. *Free Radic. Biol. Med.*, 50:1591-1598, 2011.

Sestili, P; Diamantini, G.; Bedini, A.; Cerioni, L.; Tommasini, I.; Tarzia, G.; Cantoni, O. **Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism**. *Biochem. J.* 364, 121-128, 2002.

Sharma, K.G.; Sharma, V.; Bourbonloux, A.; Delrot, s.; Bachhawat, A.K. **Glutathione depletion leads to delayed growth stasis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of partially overlapping role for thioredoxin**. *Curr. Genet.*, 38:71-77, 2000.

Siegel, D. et al. **NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: Role as a superoxide scavenger**. *Mol. Pharmacol.* 65:1238-1247, 2004

Smith WA, Arif JM, Gupta RC. **Effect of cancer chemopreventive agents on microsome-mediated DNA adduction of the breast carcinogen dibenzo[a,l]pyrene**. *Mutation Research* 412: 307-314, 1998.

Srinivasan, C.; Liba, A.; Imlay, J.A.; Valentine, J.S.; Gralla, E.B. **Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance**. *J Biol Chem* 275(38):29187-29192, 2000.

Steinmetz, Kristi A., Potter, John D. **Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review**. *Journal of the American Dietetic Association* 96, 1027-1039, 1996.

Stevenson, D.E.; Hurst, R.D. **Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more?** *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 2900 – 2916.

Stocker, R.; Keaney, J.F.Jr. **Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis**. *Physiol Rev* 84:1381–1478, 2004.

Stohs, S.J.; Bagchi, D. **Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions**. *Free Radical Biology & Medicine*, 18 (2): 321-336, 1995.

Szafer, H.; Jodynis-Liebert, J.; Cichocki, M.; Matuszewska, A.; Baer-Dubowska, W. **Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by o-toluidine**. *Toxicology* 186: 67-77, 2003.

Takagi, A.; Sai, K.; Umemura, T.; Hasegawa, R.; Kurokawa, Y. **Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane.** *Cancer Letters* 91: 139-144, 1995.

Teel, R.W. **Ellagic acid binding to DNA as a possible mechanism for its antimutagenic and anticarcinogenic action.** *Cancer Letters*, 30: 329-336, 1986.

Thort, H. et al. **The Metabolism of Menadione (2-Methyl-1,4-naphthoquinone) by Isolated Hepatocytes: a study of the implications of oxidative stress in intact cells.** *J. Biol. Chem.* 257(20): 12419-12425, 1982.

Thulstrup, P. W.; Thormann, T.; Spanget Larson, J.; Bisgaard, H. C. **Interaction between ellagic acid and calf thymus DNA studied with flow linear dichroism UV-VIS spectroscopy.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 416-421, 1999.

Toledano, M.B.; Delaunay, A; Biteau, Benoit; Spector, D; Azevedo, D. **Oxidative stress response in yeast.** In: Topics in Current Genetics, Vol. 1, Hohmann, S.; Mager, P.W.H. (Eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p-241-287, 2003.

Toledano, M.B.; Kumar, C.; Moan, N.L.; Spector, D.; Tacnet, F. **The system biology of thiol redox system in Escherichia coli and yeast: Differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis.** *FEBS Letters*, 581: 3598-3607, 2007.

Tong, W.A.; Rouault, T.A. **Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis.** *BioMetals* 20(3-4):549-564, 2007.

Toyokuni, S.; Sagripanti, J.L. **Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron.** *Free Radical Biology & Medicine* 20 (6): 859-864, 1996.

Veal, D.A.; Deere, D.; Ferrari, B.; Piper, J.; Attfield, P.V. **Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells.** *Journal of Immunological Methods* 243, 191–210, 2000.

Virgili, F.; Marino, M. **Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity.** *Free Radical Biology & Medicine* 45 (2008) 1205–1216.

Xu, C.; Li, C.Y.; Kong, A.N. **Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics.** *Arch Pharm Res.* 28(3):249-68, 2005.

Wallace, M.A.; Liou, L.L.; Martins, J.; Clement, M.H.S.; Bailey, S.; Longo, V.D.; Valentine, J.S.; Gralla, E.B. **Superoxide inhibits 4Fe-4S grupamento enzymes involved in amino acid biosynthesis: cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase.** *J. Biol. Chem.*, 279(31):32055-32062, 2004.

Watanabe, N.; Forman, H.J. **Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells.** *Arch. Biochem. Biophys.* 411(1): 145–157, 2003.

Watanabe, N.; Dickinson, D.A.; Liu, R.M.; Forman, H.J. **Quinones and Glutathione Metabolism.** *Methods in Enzymology*, 378: 319-340, 2004.

Wei, Q.Y.; Zhou, B.; Cai, Y.J.; Yang, L.; Liu, Z.L. **Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage.** *Food Chemistry* 96 (2006) 90–95.

Welch, K.D.; Davis, T.Z.; Aust, S.D. **Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397(2) 360–369, 2002.

Welker, A.F. **Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres.** [Tese de Doutorado], Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, Brasil, 2009.

Werner-Washburne, M.; Braun, E.; Johnston, G.C.; Singer, R.A. **Stationary phase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiological Reviews* 57(2) 383-401, 1993.

Wu, L.T.; Chu, C.C.; Chung, J.G.; Chen, C.-H.; Hsu, L.-S.; Liu, J.-K., Chen, S.C. **Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes.** *Mutation Research* (556): 75–82, 2004.

Yamamoto, Y.; Gaynor, R.B. **Role of the NF- κ B Pathway in the Pathogenesis of Human Disease States.** *Current Molecular Medicine* 1(3) 287-296, 2001.

Yoshino, M.; Murakami, K. **Interaction of Iron with Polyphenolic Compounds: Application to Antioxidant Characterization.** *Analytical Biochemistry* 257, 40–44 (1998)

Zadziński, R.; Fortuniak, A.; Biliński, T.; Grey, M.; Bartosz, G. **Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione.** *Biochem Mol Biol Int.* 44(4):747-59, 1998.

Zyracka, E.; Zadrag, R.; Koziol, R.; Krzepilko, A.; Bartoszi, G.; Bilinski, T. **Yeast as a biosensor for antioxidants: simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase.** *Acta Biochim. Polon.*, 52(3): 679-684, 2005.