

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA E FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENVELHECIMENTO HUMANO

Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Marcela Geisa Becegatto

Passo Fundo

2014

Marcela Geisa Becegatto

Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Envelhecimento Humano.

Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Telma Elita Bertolin
Coorientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Oro

Passo Fundo

2014

CIP – Catalogação na Publicação

B389r Becegatto, Marcela Geisa

Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* / Marcela Geisa Becegatto. – 2014.

[116] f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, 2014.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Telma Elita Bertolin.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Oro.

1. Envelhecimento. 2. *Spirulina platensis*. 3. Radicais livres (Química) – Efeito fisiológico. I. Bertolin, Telma Elita, orientadora. II. Oro, Tatiana, coorientadora. III. Título.

CDU: 613.98

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação:

*"Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* no envelhecimento da *Saccharomyces cerevisiae*"*

Elaborada por

MARCELA GEISA BECEGATTO

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
"Mestre em Envelhecimento Humano"

Aprovada em: 29/05/2014
Pela Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Oro
Coorientadora e Presidente da Banca Examinadora
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Prof^ª. Dr^ª. Marlene Doring
Universidade de Passo Fundo – UPF/ppgEH

Prof^ª. Dr^ª. Vera Maria Rodrigues
Universidade de Passo Fundo – UPF/PPGCTA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e a Nossa Senhora pela proteção divina.

À Universidade de Passo Fundo pela oportunidade de cursar uma Pós-Graduação com qualidade de ensino e pesquisa. Encontrei aqui toda estrutura necessária aos meus estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano (PPGEH) pela bolsa de estudos e possibilidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

Aos professores doutores que sempre incentivaram e participaram de minha formação. Em especial, à minha orientadora Telma Elita Bertolin, pela oportunidade, confiança e apoio. À co-orientadora Tatiana Oro pela prestatividade e dedicação.

Aos meus amados pais Justino Becegatto e Marisa R. L. Becegatto pelo amor, carinho e incentivo. Vocês sempre me guiaram pelo caminho do bem e me ensinaram valores. A presença constante de vocês dois me fortalece para prosseguir em busca de meus sonhos e ideais.

À minha irmã, Maiara Greice Becegatto, por tudo. Amo você e sou imensamente grata pela sua amizade.

Ao amor da minha vida, João Arthur Blume, por estar ao meu lado em todos os momentos e sempre me ajudar com palavras, gestos e ações.

Aos colegas e amigos do mestrado que compartilharam estes dois anos, somando conhecimentos, apoiando nas horas difíceis e descontraindo nas horas vagas.

Aos colegas de laboratório que auxiliaram no desenvolvimento de experimentos e incentivaram a realização da pesquisa.

Enfim, por meio destas singelas palavras espero que todos se sintam acarinhados, lembrados e agradecidos. Sou muito feliz por tê-los em minha vida!

EPIGRAFE

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

BECEGATTO, Marcela Geisa. Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*. 2014. [116] f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

O aumento da expectativa de vida da população frequentemente está associado com o aparecimento de doenças, declínios e demências e, por esta razão, as pesquisas buscam desenvolver terapias preventivas, com o uso de substâncias funcionais e da restrição calórica. As substâncias funcionais são componentes bioquímicos ativos, considerados promotores de saúde, pois diminuem os riscos de doenças. Já a restrição calórica apresenta efeitos na longevidade de diversos organismos modelo, tais como, leveduras, vermes, moscas e primatas. Estudos demonstram que a restrição calórica modifica o metabolismo, alterando a relação de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD: NADH), o que ativa determinadas enzimas chamadas sirtuínas. Por sua vez, as sirtuínas atuam em processos de reparação, silenciamento genético e manutenção dos telômeros e estão se tornando alvos terapêuticos interessantes para o estudo de desordens neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington. No presente estudo, foi testado o potencial da *Spirulina platensis*, uma cianobactéria, que apresenta ação antioxidante celular, cicatrizante, anti-inflamatória, auxilia no emagrecimento, entre outras propriedades. Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito da restrição calórica e do extrato aquoso de *Spirulina platensis* frente ao estressor Fe^{2+} no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada aos genes SIR 1, 2, 3 e 4. Para tal, realizaram-se experimentos com distintos tratamentos contendo extrato aquoso de *Spirulina platensis*; sulfato ferro; extrato aquoso de *Spirulina platensis* + sulfato ferro; e o padrão para comparação. As cepas da levedura *S. cerevisiae* foram expostas aos tratamentos, antes e após o envelhecimento das células. Os experimentos realizados foram: lipoperoxidação pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dosagem da enzima superóxido dismutase (SOD) pelo sistema de detecção adrenalina-citocromo. Os resultados mostraram o efeito do extrato de *Spirulina platensis* e da restrição calórica nas diferentes cepas. Na ausência do gene SIR2, o extrato de *S. platensis* diminuiu a peroxidação lipídica, antes e após o envelhecimento das células. Quando da utilização das duas terapias aumentou consideravelmente a peroxidação da cepa mutante *Sir2Δ*. Este último resultado indica a possibilidade de um efeito pró-oxidante para as células, após o envelhecimento. Em contrapartida, no mutante *Sir4Δ*, a junção das duas terapias atenuou ($p=0,031166$) a peroxidação lipídica, antes do envelhecimento da levedura. Os resultados dos ensaios enzimáticos evidenciaram o efeito da RC antes e após o envelhecimento das células, demonstrando a efetividade desta terapia diante dos tratamentos realizados. Em todas as cepas estudadas a RC foi capaz de diminuir a atividade da enzima, indicando benefício para as células que não necessitaram da ativação da superóxido dismutase para defesa celular. Ao concluir esse estudo apontamos que o efeito do extrato de *Spirulina platensis* foi evidente com a atenuação da peroxidação lipídica, bem como da atividade

de superóxido dismutase. A terapia RC foi a mais efetiva, antes e após o envelhecimento das células e em todas as cepas estudadas. Ambas as terapias utilizadas preveniram os danos induzidos por Fe^{2+} .

Palavras-chave: 1. Envelhecimento. 2. Ferro. 3. Levedura. 4. Radicais livres. 5. Sirtuínas.

ABSTRACT

BECEGATTO, Marcela Geisa. Calorie restriction and extract of *Spirulina platensis* in aging of *Saccharomyces cerevisiae*. 2014. [116] f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

The increased life expectancy of the population often is associated with the onset of diseases, declines and dementias, and for this reason, research seeking to develop preventive therapies, using functional substances and caloric restriction. The functional substances are active biochemical components, considered health promoters because it reduces the risk of disease. Since caloric restriction has effect on the longevity of several model organisms, such as yeast, worms, flies and primates. Studies have shown that caloric restriction alters the metabolism by altering the ratio of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD: NADH), which activates certain enzymes called sirtuins. In turn, sirtuins act in repair processes, gene silencing and telomere maintenance and are becoming popular therapeutic targets for the study of neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease, Alzheimer's and Huntington. In the present study, we tested the potential of *Spirulina platensis*, a cyanobacterium, which presents cellular antioxidant action, anti-inflammatory, antioxidant aids in weight loss, among others. In this context, we aimed to evaluate the effect of caloric restriction and the aqueous extract of *Spirulina platensis* against stressor Fe^{2+} aging of *Saccharomyces cerevisiae* deleted SIR 1, 2, 3 and 4 genes. To this end, experiments were carried out with different treatments containing aqueous extract of *Spirulina platensis*; iron sulfate; aqueous extract of *Spirulina platensis* + iron sulfate; and the standard of comparison. The strains of *S. cerevisiae* were exposed to treatments before and after aging. The experiments were performed: lipid peroxidation by Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and dosage of the enzyme superoxide dismutase (SOD) by the system detection adrenaline - cytochrome. In the absence of the SIR2 gene of *S. platensis* extract decreased lipid peroxidation before and after the aging of cells. When using the two therapies has increased the peroxidation of mutant *Sir2Δ*. This latter result indicates the possibility of a pro-oxidant effect to the cells after aging. In contrast, the mutant *Sir4Δ*, the junction of the two therapies attenuated ($p=0.031166$) lipid peroxidation, before aging yeast. The results of enzyme assays demonstrated the effect of RC before and after the aging of cells, demonstrating the effectiveness of this therapy before the treatments performed. In all strains studied the RC was able to decrease the activity of the enzyme, indicating benefit to the cells that did not require the activation of superoxide dismutase mobile defense. By completing this study point out that the effect of the extract of *Spirulina platensis* was evident with the attenuation of lipid peroxidation and the activity of superoxide dismutase. The RC was the most effective therapy, before and after aging of cells and in all strains studied. Both therapies used prevented the damage induced by Fe^{2+} .

Key words: 1. Aging. 2. Iron. 3. Yeast. 4. Free radicals. 5. Sirtuins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resultados da peroxidação lipídica celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cepas padrão e mutante <i>Sir1Δ</i> antes e após o envelhecimento	36
Figura 2 - Resultados da peroxidação lipídica celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cepas padrão e mutante <i>Sir2Δ</i> antes e após o envelhecimento	37
Figura 3 - Resultados da peroxidação lipídica celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cepas padrão e mutante <i>Sir3Δ</i> antes e após o envelhecimento	37
Figura 4 - Resultados da peroxidação lipídica celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cepas padrão e mutante <i>Sir4Δ</i> antes e após o envelhecimento	38
Figura 5 - Resultados da atividade da superóxido dismutase, cepas padrão e mutante <i>Sir1Δ</i> antes e após o envelhecimento das células.....	39
Figura 6 - Resultados da atividade da superóxido dismutase, cepas padrão e mutante <i>Sir2Δ</i> antes e após o envelhecimento das células.....	40
Figura 7 - Resultados da atividade da superóxido dismutase, cepas padrão e mutante <i>Sir3Δ</i> antes e após o envelhecimento das células.....	41
Figura 8 - Resultados da atividade da superóxido dismutase, cepas padrão e mutante <i>Sir4Δ</i> antes e após o envelhecimento das células.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra – Acético
Fe ²⁺	Íon ferroso
MDA	Malonaldeído
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
RC	Restrição calórica
SIR	Silent Information Regulator
<i>Sir1Δ</i>	Cepa deletada ao gene Silent Information Regulator 1
<i>Sir2Δ</i>	Cepa deletada ao gene Silent Information Regulator 2
<i>Sir3Δ</i>	Cepa deletada ao gene Silent Information Regulator 3
<i>Sir4Δ</i>	Cepa deletada ao gene Silent Information Regulator 4
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
YPD	Meio de cultivo contendo glicose, extrato de levedura e peptona

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cepas e genótipo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
Quadro 2 - Composição do meio YPD.....	28
Quadro 3 - Meios de cultura utilizados para o cultivo das células de leveduras	29
Quadro 4 - Preparo das soluções para a realização das curva de peso seco das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Quadro 5 - Delineamento experimental para verificação do efeito da restrição calórica e do extrato aquoso de <i>Spirulina platensis</i> no cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Quadro 6 - Composição das soluções para utilização na metodologia TBARS	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA I	22
2.1 INTRODUÇÃO	24
2.2 METODOLOGIA	26
2.2.1 Local dos experimentos	26
2.2.2 Composto testado	26
2.2.3 Obtenção do extrato aquoso de <i>Spirulina platensis</i>	27
2.2.4 Modelo experimental	27
2.2.5 Meios de cultura	29
2.2.6 Condições de cultivo	29
2.2.7 Curvas de peso seco	30
2.2.8 Delineamento experimental	31
2.2.9 Simulação do envelhecimento cronológico	32
2.2.10 Preparação das amostras para análise de teor de oxidação de lipídios	32
2.2.11 Teor de oxidação de lipídios pelo método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	33
2.2.12 Curva padrão 1,1,3,3 tetrametoxipropano (TMP)	34
2.2.13 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) pelo sistema de detecção adrenalina-citocromo	34
2.2.14 Análise dos dados	35
2.3 RESULTADOS	35
2.4 DISCUSSÃO	42
2.5 CONCLUSÃO	44
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	60
Anexo A. Comprovante de submissão	61
APÊNDICES	63
Apêndice A. Curvas de peso seco.	64
Apêndice B. Curva Analítica com padrão 1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano (TMP).	68
Apêndice C. Projeto de pesquisa.	70

1 INTRODUÇÃO

A população idosa vem aumentando significativamente e segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) estima-se que em 2050, 25% da população mundial terá 60 anos ou mais. Isso é reflexo do declínio no número de nascimentos, da presença da medicina preventiva com recursos tecnológicos, das vacinas, do saneamento básico, do tratamento da água, dentre outros avanços que têm interferido no padrão de mortalidade fazendo com que aumente a longevidade máxima (KACHAR, 2010).

O aumento da população idosa reflete em vários setores econômicos, educacionais, sociais, culturais e, principalmente, na área da saúde. O ganho na longevidade não está sendo alcançado de forma satisfatória, devido à incidência de declínios cognitivos e psicológicos, doenças crônicas e problemas orgânicos e psicológicos (NETTO, 2004; VERAS, 2012). Diante desse cenário, as pesquisas científicas têm direcionado esforços para elaborar e desenvolver terapias modificadoras, capazes de indicar alvos-terapêuticos importantes no combate e tratamento de doenças características do envelhecimento humano.

Os estudos sobre o processo de envelhecimento humano contribuíram para o desenvolvimento de diversas teorias, dentre as quais as teorias biológicas do envelhecimento que procuram explicar as características deste processo complexo e irreversível. Entre as principais teorias do envelhecimento humano conhecidas, destacam-se: a Teoria Genética, a Teoria Imunológica, a Teoria do Acúmulo de Danos, a Teoria das Mutações, a Teoria do Uso e Desgaste e a Teoria dos Radicais Livres. A Teoria dos Radicais Livres é a mais estudada das últimas décadas e explica o envelhecimento a partir

dos danos causados aos constituintes orgânicos, devido à menor atividade das defesas antioxidantes (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010; FRIES; PEREIRA, 2011).

A teoria dos radicais livres foi proposta em 1956 por Denham Harman e explica que o envelhecimento é consequência dos efeitos deletérios nas células, provocados pelas espécies reativas de oxigênio (EROS), que por serem tóxicas tornam-se capazes de destruir biomoléculas e estimular o envelhecimento dos organismos vivos. Inicialmente, acreditava-se que os radicais livres eram gerados por fatores ambientais como a contaminação por compostos químicos tóxicos e a radiação, no entanto, hoje se sabe que os radicais livres podem ser formados por processos fisiológicos normais do organismo. São inúmeros os processos destrutivos que levam ao envelhecimento das células, através da produção de radicais livres que ocorre na mitocôndria e nas enzimas (xantina oxidase, NADPH-oxidase e óxido nítrico sintase). Portanto, a manutenção dos níveis de EROS é essencial para funcionamento normal dos processos fisiológicos e, quando há um desequilíbrio, isso gera a ativação de cascatas enzimáticas perigosas e estimulação de vários estados patológicos, como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e inflamação (AFANAS'EV, 2010).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não pareados em sua camada orbital externa, o que explica sua instabilidade e elevada reatividade. Quando os radicais livres são formados eles buscam se estabilizar, cedendo ou doando elétrons às espécies químicas vizinhas. Desta forma, sucede-se uma reação em cadeia que culmina por alterar a conformação, a estrutura e função dos componentes celulares (MACHLIN; BENDICH, 1987; HARMAN, 2003).

O desequilíbrio entre a taxa de geração e a capacidade de remoção dos radicais livres, resulta em estresse oxidativo. Erros nos sistemas de manutenção e reparação endógenos reduzem a tolerância ao estresse, podendo provocar doenças ou morte. Portanto, os mecanismos de defesa endógenos atuam para prevenir as modificações oxidativas que deixam o organismo mais susceptível, evitando prejuízos (RATTAN, 2006; SULTANA; PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2013).

Em condições patológicas, as espécies reativas modificam proteínas e outros constituintes celulares. Tais modificações podem inativar enzimas e degenerar a estrutura

de proteínas ou ativar fatores de transcrição e sistemas proteolíticos (CAVALCANTE; BRUIN, 2009; SULTANA; PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2013).

A partir dos fundamentos da teoria dos radicais livres, buscou-se simular o estresse oxidativo no modelo escolhido por meio de um agente estressor. As pesquisas demonstram que o ferro em excesso no organismo passa a promover reações oxidativas, por doar ou aceitar elétrons livres durante reações intracelulares, catalisando a formação de radicais livres (FERNANDEZ et al., 2007; CABANTCHIK, 2014).

Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes na ocorrência das reações de oxidação são Cu^{1+} e Fe^{2+} . No entanto, a importância do ferro é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade e, na maior parte do tempo, ele encontra-se complexado com proteínas de transporte (transferrina) e armazenamento (ferritina e hemosiderina) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A existência de ferro livre ou em excesso no organismo encontra-se associada a inúmeros eventos patológicos, devido a facilidade com que este íon é reversivelmente oxidado e reduzido, fazendo com que seja potencialmente danoso, visto, à sua capacidade em gerar espécies reativas e induzir o estresse oxidativo celular e seus efeitos secundários (PATEL; RAMAVATARAM, 2012).

Diante do exposto, os organismos vivos necessitam de proteção celular que pode advir de substâncias antioxidantes, ou ainda, de ações preventivas contra a sobrecarga de estresse oxidativo (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008). O uso de antioxidantes naturais e sintéticos pode estimular o sistema antioxidante endógeno, trazendo benefícios terapêuticos. Apesar disso, deve-se determinar a dose, a via de administração, o momento e o antioxidante ideal para cada doença (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KIRKHAM; RAHMAN, 2006).

As substâncias antioxidantes, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem retardar processos oxidativos. São moléculas que neutralizam radicais livres, recebendo ou doando elétrons para eliminar a condição desemparelhada do radical (ROCHA et al., 2007; LÜ et al., 2010).

Somado às defesas intrínsecas, o consumo de antioxidantes da dieta ajuda a manter os sistemas defensivos do organismo. No sistema enzimático, estão presentes as enzimas

superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. Já os componentes antioxidantes não enzimáticos são representados por minerais, vitaminas e compostos fenólicos, provenientes da dieta (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; PAPAS, 1999).

A atividade dos sistemas de defesa endógenos vai diminuindo com o envelhecer, propiciando o aumento da propagação de espécies reativas. Desta forma, mudanças de hábitos e o consumo de antioxidantes naturais podem melhorar a saúde e proporcionar o aumento da longevidade. A indústria de alimentos tem interesse crescente pelos alimentos funcionais, que são aqueles que possuem componentes bioquímicos ativos e são considerados promotores de saúde, pois diminuem os riscos de doenças (MORAES; COLLA, 2006; GUARIENTI; BERTOLIN; COSTA, 2010; SILVA; FERRARI, 2011).

Neste contexto se destaca a *Spirulina platensis*, uma cianobactéria encontrada nas águas alcalinas de lagos vulcânicos. Em sua composição constam 62% de aminoácidos e uma extensa gama de pigmentos xantofila e carotenos. Apresenta alto teor e qualidade de proteínas, alto teor de vitamina B₁₂, predominância de ácidos graxos polinsaturados e é completamente não-tóxica (VÍLCHEZ et al., 1997; BHAT; MADYASTHA, 2000; ESTRADA; BESCÓS; VILLAR DEL FRESNO, 2001; BENEDETTI et al., 2004).

As propriedades da *Spirulina platensis* têm sido utilizadas para diversas finalidades, com aplicações na área da medicina, em estudos de redução de colesterol, redução de hipertensão, doenças cardíacas, controle de obesidade e deficiência de zinco.

A *Spirulina platensis* é capaz de prevenir a deterioração no processamento de pescado seco e surge como alternativa para o uso do antioxidante sintético BHT (BERTOLIN et al., 2011a). Além disso, seu cultivo pode ser direcionado para produção de compostos de interesse comercial, como vitaminas e enzimas (COZZA, 1999).

O uso da *Spirulina platensis* diante de uma situação de estresse oxidativo externo, resultou em minimização do dano oxidativo. A ação da cianobactéria impediu o início do processo oxidativo e a formação de radicais livres, prevenindo os sistemas biológicos (BERTOLIN et al., 2011b). Segundo Chu e cols. (2010), o extrato aquoso de *Spirulina platensis* pode ser agregado em produtos alimentícios e bebidas, sendo considerado um ingrediente funcional.

Na atualidade, as pesquisas têm sido direcionadas para a compreensão dos mecanismos que fundamentam o prolongamento da vida. A partir do conhecimento das rotas metabólicas do organismo, desenvolvem-se terapias preventivas. Neste contexto destaca-se a restrição calórica (RC) que se caracteriza pela diminuição das calorias da dieta sem desnutrição e, é capaz de prolongar o tempo de vida em diversos organismos, tais como, leveduras, roedores, vermes, moscas e primatas não-humanos. O tipo de regime alimentar, o gênero e a idade podem influenciar nos efeitos da RC. Devido à dificuldade em cumprir a verdadeira restrição de calorias da dieta, os pesquisadores têm buscado compostos miméticos aos efeitos benéficos da RC (ARSLAN-ERGUL; OZDEMIR; ADAMS, 2013; LEE; MIN, 2013; LIBERT; GUARENTE, 2013).

Embora a restrição calórica possa melhorar substancialmente a saúde de roedores, a sua aplicabilidade em organismos superiores é incerta (LIBERT; GUARENTE, 2013). Um estudo publicado por Mattson e cols. (2012) não demonstrou melhora na sobrevivência de macacos *Rhesus* jovens e mais velhos. Contudo, os mecanismos subjacentes à longevidade pela restrição calórica ainda não foram identificados, por isso as pesquisas genéticas com animais e as investigações controladas em humanos podem auxiliar no controle do processo de envelhecimento e na descoberta de novos caminhos, com indicações terapêuticas (LEE; MIN, 2013).

Segundo Centenaro e cols. (2010) a restrição calórica pode estender o tempo de vida, pois atenua os danos oxidativos. Em contraste, os experimentos de Agarwal et al. (2005), mostraram que em condições de restrições de glicose, as células consomem mais oxigênio, subsequentemente, aumentando a geração de radicais livres.

Outra possibilidade é que os efeitos da RC nas células possam ser mediados pela ação de enzimas chamadas sirtuínas, presentes nas células eucarióticas. As sirtuínas são proteínas deacetilases de histonas, NAD-dependentes que estão relacionadas com mecanismos de sobrevivência. Elas aumentam a estabilidade do genoma através de processos de reparação, silenciamento genético e manutenção dos telômeros e são ativadas quando ocorre a elevação nos níveis de estresse oxidativo, impedindo danos no genoma (ECHEVERRI-RUÍZ; MOCKUS-SIVICKAS, 2010; MERKSAMER, et al. 2013).

De acordo com esta hipótese, a RC ativa caminhos de estresse, alterando o metabolismo e o consumo de oxigênio pelas células, que precisam buscar outros substratos como fonte de energia. Conseqüentemente, são observadas modificações na concentração de nicotinamida e na relação NAD:NADH, o que ativa as sirtuínas. As sirtuínas quando ativadas interferem no tempo de vida das células, prolongando-o, por meio da modificação química de diversas proteínas envolvidas em processos celulares relacionados diretamente com a longevidade. Além disso, os polifenóis das plantas também podem ativar as sirtuínas, provocando o mesmo efeito na longevidade, ou seja, mimetizando os efeitos benéficos da RC (HOWITZ et al., 2003; FINKEL, 2003).

Em contrapartida, Anderson e cols. (2003b) verificaram que o aumento de NAD não é a explicação para o aumento da atividade da sirtuína 2 em células sob condições de RC. Para esses autores, é improvável que o estado redox de NAD regule SIR2.

As sirtuínas são produtos de genes específicos e a expressão destes genes, bem como a atividade dessas proteínas nos tecidos são fortemente afetadas por mudanças no ambiente, na dieta e estilo de vida. Alguns fatores referidos por influenciarem na expressão das sirtuínas, são: restrição calórica, exercício físico, álcool, fumo, exposição ao frio, estresse oxidativo e administração de compostos como resveratrol, quercetina e melatonina (KELLY, 2010).

Além disso, as sirtuínas são alvos terapêuticos interessantes para o estudo de desordens neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington (OLIVEIRA; PAIS; OUTEIRO, 2010). A expressão ou a inativação dos genes que codificam as enzimas sirtuínas podem determinar alterações importantes, como é o caso da inibição de SIR2 que atua na proteção dos neurônios, impedindo a morte celular num modelo de Doença de Parkinson, desenvolvido por Garske, Smith e Denu (2007).

Os pesquisadores têm demonstrado o papel das sirtuínas em inúmeras funções biológicas e a perspectiva futura é evidenciar se elas podem se tornar alvo de novas terapias para atenuar as doenças associadas à idade, tais como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares e, com isso, estender o tempo de vida (RAHMAN; ISLAM, 2011).

Para esta pesquisa, foi escolhida a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por caracteriza-se como bom modelo para o estudo *in vivo* de antioxidantes naturais; por seu

genoma já estar totalmente sequenciado, propiciando modificações genéticas; por apresentar fácil cultivo e manutenção; por ser um organismo eucarionte e proteger-se do estresse por meio de mecanismos como a síntese de enzimas antioxidantes (GRANDI, 2001; SILVA et al., 2012; RAMOS et al., 2013).

Além disso, os ensaios realizados com microrganismos são de relativa facilidade e rapidez, e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* permite estudar a longevidade, por meio da avaliação da sobrevivência celular, mesmo após tratamento com sintéticos e compostos antioxidantes naturais (GUARIENTI; COSTA; BERTOLIN, 2010).

O uso da levedura como modelo de célula experimental tem auxiliado no conhecimento e no tratamento de uma série de patologias humanas devido à conservação de mecanismos bioquímicos que são observados nas células humanas (BERTOLIN et al., 2009; OUTEIRO et al., 2007; OUTEIRO; LINDQUIST, 2003).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem a capacidade de detectar e responder adequadamente à ameaça constante de estresse oxidativo, usando estratégias de morte celular programada ou mecanismos de sobrevivência. É imprescindível ressaltar que estas vias defensivas são largamente conservadas em mamíferos. Além disso, a levedura é um modelo de pesquisa cuja utilização pode elucidar muitos aspectos importantes patologias humanas que são mais difíceis de estudar usando outros organismos modelo eucariotos mais complexos (FARRUGIA; BALZAN, 2012).

O objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito da restrição calórica e do extrato aquoso de *Spirulina platensis* frente ao estressor Fe^{2+} no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

A presente dissertação está organizada da seguinte forma: a Introdução apresenta uma breve revisão de literatura sobre envelhecimento humano, teorias biológicas do envelhecimento, radicais livres, antioxidantes, restrição calórica, sirtuínas e *Saccharomyces cerevisiae*; A Produção Científica I em forma de artigo, submetido ao periódico “Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento”, discute os achados da pesquisa experimental desenvolvida; após seguem as Considerações Finais da dissertação onde estão descritas as conclusões e as sugestões para futuros trabalhos.

Subsequentemente, encontram-se as referências utilizadas no texto, os anexos contendo os comprovantes de submissão e os apêndices com as curvas de peso seco, a curva analítica com padrão TMP e o projeto de pesquisa, elaborado e qualificado anteriormente à realização do trabalho experimental.

2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA I

Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Marcela Geisa Becegatto¹

Tatiana Oro²

Jorge Alberto Vieira Costa³

Telma Elita Bertolin⁴

¹ Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Mestranda em Envelhecimento Humano pela Universidade de Passo Fundo. E-mail: marcelabecegatto@yahoo.com.br. Endereço para correspondência: Rua Jacinto Villanova, 179, apto 101, Bairro Annes, Passo Fundo/RS. CEP 99010-290.

² Graduada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Maria. Mestre em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina. Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina. Pós-doutoranda em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande.

³ Graduado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Rio Grande. Pós-graduado em Biotecnologia moderna pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas. Professor Associado da Universidade Federal do Rio Grande.

⁴ Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade de Passo Fundo. Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas. Doutora em Tecnologia

RESUMO

Terapias preventivas apresentam relação com as defesas do organismo e com a extensão do tempo de vida. A restrição calórica (RC) caracterizada pela diminuição das calorias da dieta, apresenta efeitos na longevidade, por meio de alterações no metabolismo celular que interferem na concentração de nicotinamida adenina dinucleotídeo, cofator para a ativação das enzimas sirtuínas. Essas enzimas atuam em processos de reparação, silenciamento genético e manutenção dos telômeros, aumentando a longevidade celular. Com o envelhecimento, as defesas das células diminuem e deixam o organismo exposto ao estresse. O consumo de substâncias com propriedades antioxidantes pode auxiliar na proteção celular. A *Spirulina platensis* que apresenta propriedades funcionais foi utilizada como terapia antioxidante, a fim de atenuar os danos oxidativos induzidos pelo íon ferroso. Objetivou-se avaliar o efeito da restrição calórica e do extrato de *Spirulina platensis* frente ao Fe^{2+} no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada aos genes SIR 1, 2, 3 e 4. Para tal, foram realizados experimentos com extrato aquoso de *Spirulina platensis*; sulfato ferroso; extrato aquoso de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso; e padrão. As cepas foram expostas aos tratamentos, antes e após o envelhecimento celular. As análises de teor lipoperoxidação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dosagem da superóxido dismutase (SOD) pelo sistema de detecção adrenalina-citocromo. As terapias

Bioquímica Farmacêutica pela Universidade de São Paulo. Pós-doutoranda na Universidade de Lisboa – Portugal. Professora Titular da Universidade de Passo Fundo.

testadas mostraram resultados importantes na proteção celular. Além disso, as cepas deletadas apresentaram menores valores de peroxidação lipídica, indicando benefícios na função celular. Conclui-se que as terapias antioxidantes são eficazes e apresentam potencial para atenuar danos oxidativos.

Palavras-chave: Envelhecimento. Ferro. Levedura. Sirtuínas. Radicais livres.

2.1 INTRODUÇÃO

Na atualidade a compreensão dos mecanismos que regem o envelhecimento humano, propicia o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratar e atenuar doenças, elevando a longevidade da população.

De acordo com a teoria dos radicais livres elaborada em 1956 por Denham Harman, o envelhecimento é consequência dos efeitos deletérios nas células, provocados pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) que por serem tóxicas tornam-se capazes de destruir biomoléculas e estimular o envelhecimento dos organismos vivos. Inicialmente, acreditava-se que os radicais livres seriam gerados por fatores ambientais como a contaminação por compostos químicos tóxicos e a radiação. No entanto, hoje se sabe que os radicais livres podem ser formados por processos fisiológicos normais do organismo. (AFANAS'EV, 2010).

O ferro em excesso no organismo promove reações oxidativas, por doar ou aceitar elétrons livres durante reações intracelulares, catalisando a formação de radicais livres. A formação de radicais livres pode ultrapassar a capacidade antioxidante e lesar seriamente os constituintes celulares (FERNANDEZ et al., 2007; CABANTCHIK, 2014). Diante disso, as terapias antioxidantes podem atuar protegendo o organismo contra esses efeitos deletérios. A restrição calórica, por exemplo, é reportada por estender o tempo de vida em diversos organismos-modelo, pois atenua os danos oxidativos celulares (CENTENARO et al., 2010).

A RC ativa caminhos de estresse, alterando o metabolismo e o consumo de oxigênio pelas células, que precisam buscar outros substratos como fonte de energia. Consequentemente, são observadas modificações na concentração de nicotinamida adenina

dinucleotídeo e na relação NAD:NADH, o que ativa as sirtuínas. As sirtuínas quando ativadas interferem no tempo de vida das células, prolongando-o, por meio da modificação química de diversas proteínas envolvidas em processos celulares relacionados diretamente com a longevidade. Além disso, os polifenóis das plantas também podem ativar as sirtuínas, provocando o mesmo efeito na longevidade, ou seja, mimetizando os efeitos benéficos da RC (HOWITZ et al., 2003; FINKEL, 2003).

Os efeitos benéficos da restrição calórica sobre a longevidade requerem a ativação das sirtuínas, proteínas deacetilases de histonas NAD-dependentes que estão relacionadas com mecanismos de sobrevivência. As sirtuínas aumentam a estabilidade do genoma através de processos de reparação, silenciamento genético e manutenção dos telômeros e são ativadas quando ocorre a elevação nos níveis de estresse oxidativo, impedindo danos no genoma. Portanto, elas estão intimamente ligadas com a resposta aos danos celulares causados pelo estresse oxidativo (KAEBERLEIN, M. et al., 2002; ECHEVERRI-RUÍZ; MOCKUS-SIVICKAS, 2010; MERKSAMER, et al. 2013).

Pesquisas tem demonstrado o papel das sirtuínas em inúmeras funções biológicas e a perspectiva futura é evidenciar se elas podem se tornar alvo de novas terapias para atenuar as doenças associadas à idade, tais como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares e, com isso, estender o tempo de vida (RAHMAN; ISLAM, 2011).

Uma linha de pesquisa em acendência é a descoberta de substâncias funcionais com capacidade terapêutica e antioxidante. No presente estudo o potencial da *Spirulina platensis* foi testado.

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria encontrada nas águas alcalinas de lagos vulcânicos. Em sua composição constam 62% de aminoácidos e uma extensa gama de pigmentos xantofilas e carotenos. Apresenta alto teor e qualidade de proteínas, alto teor de vitamina B₁₂, predominância de ácidos graxos polinsaturados e é completamente não-tóxica (VÍLCHEZ et al., 1997; BHAT; MADYASTHA, 2000; ESTRADA; BESCÓS; VILLAR DEL FRESNO, 2001; BENEDETTI et al., 2004). Ela possui propriedades funcionais e estudos indicam a possibilidade de incorporá-la como suplemento dietético (BERTOLIN et al., 2011a; CHU et al., 2010).

Apesar de estudos anteriores indicarem a ação antioxidante da *Spirulina platensis*, pretende-se investigar sua capacidade diante de uma situação de estresse causada pelo íon ferroso.

Para desenvolver as investigações buscou-se um modelo simples, que pudesse responder ao estresse indicando os efeitos das terapias testadas, restrição calórica e extrato aquoso de *Spirulina platensis*. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucarioto, pouco complexo, com genoma totalmente sequenciado e apresenta as características de fácil cultivo, rapidez de proliferação e células semelhantes às de outros organismos, incluindo os seres humanos. Além disso, tem a capacidade de detectar e responder adequadamente à ameaça constante de estresse oxidativo, usando estratégias de morte celular programada ou mecanismos de sobrevivência (GUARIENTI; COSTA; BERTOLIN, 2010; FARRUGIA; BALZAN, 2012).

Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito da restrição calórica e do extrato de *Spirulina platensis* frente ao estresse oxidativo causado por Fe^{2+} no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada aos genes SIR 1, 2, 3 e 4.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Local dos experimentos

A pesquisa experimental foi realizada no Laboratório de Fermentações da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo.

2.2.2 Composto testado

O composto utilizado no estudo foi o extrato aquoso da microalga *Spirulina platensis*, proveniente do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande.

2.2.3 Obtenção do extrato aquoso de *Spirulina platensis*

O extrato foi obtido por meio de um processo de três ciclos sucessivos de congelamento a 0 °C durante 3h e descongelamento a 4 °C durante 3 h, de 1 g da microalga em pó adicionada a 30 mL de água destilada acondicionadas em frasco plástico com tampa. Após realizou-se centrifugação a 6000 rpm durante 15min e o sobrenadante foi extraído, constituindo o extrato aquoso de *Spirulina platensis* (COSTA et al., 2005).

A concentração do extrato aquoso de *Spirulina platensis* foi determinada através da **Equação 1**, de acordo com Benett e Bogorad (1973).

$$CE = \frac{Abs_{620} - 0,474(Abs_{652})}{5,34} \quad (1)$$

Em que:

CE = concentração do extrato (mg/mL)

Abs620 = absorbância em 620 nm

Abs652 = absorbância em 652 nm

0,474 = coeficiente de extinção específica

5,24 = coeficiente de extinção específica

2.2.4 Modelo experimental

As cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* deletadas aos genes SIR1, SIR2, SIR3 e SIR4, foram obtidas da *Euroscarf*, Frankfurt/Germany. O **Quadro 1** apresenta as cepas que foram utilizadas nos experimentos e seus respectivos genótipos.

Quadro 1 Cepas e genótipos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Cepas	Genótipos
*BY4741	MAT A; his 3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0
SIR 1	Isogênica a BY4741 exceto o gene <i>sir1::kMX4</i>
SIR 2	Isogênica a BY4741 exceto o gene <i>sir2::kMX4</i>
SIR 3	Isogênica a BY4741 exceto o gene <i>sir3::kMX4</i>
SIR 4	Isogênica a BY4741 exceto o gene <i>sir4::kMX4</i>

*Cepa controle

As cepas de levedura foram mantidas em meio Yeast Peptone Dextrose (YPD) sob refrigeração a 4 °C e repiques periódicos foram realizados em meio YPD para a manutenção dos micro-organismos. No **Quadro 2** está apresentada a composição do meio YPD.

Quadro 2 Composição do meio YPD

Componentes	Composição (%)
Glicose	2,0
Peptona	2,0
Extrato de levedura	1,0
Ágar	2,0

2.2.5 Meios de cultura

O **Quadro 3** apresenta os meios de cultura utilizados para obtenção da massa celular de leveduras utilizada para a realização dos experimentos em condições nutricionais normais e em restrição calórica.

Quadro 3 Meios de cultura utilizados para o cultivo das células de leveduras

Componentes	Composição (%)			
	Sem RC	Sem RC	Com RC	Com RC
Glicose	2	2	0,5	0,5
Peptona	2	2	2	2
Extrato de levedura	1	1	1	1
Extrato de <i>Spirulina platensis</i>	Presença	Ausência	Presença	Ausência

RC: Restrição calórica.

2.2.6 Condições de cultivo

As leveduras retiradas de um repique fresco em meio sólido foram cultivadas em meio YPD líquido com restrição calórica (0,5% de glicose) ou sem restrição calórica (2% de glicose). Após a realização deste pré-inóculo, as culturas foram incubadas em temperatura de 28 °C em agitador orbital ajustado para 160 rpm. Após aproximadamente 24 horas, alíquotas de 10 mL do pré-inóculo foram acrescentadas a erlemmeyers contendo 100 mL de meio de cultivo YPD líquido.

Estas amostras foram recolocadas em agitador orbital para proporcionar o crescimento das leveduras até a primeira fase exponencial de crescimento (entre 0,5 e 0,9

mg de peso seco de células/mL). O crescimento celular foi avaliado através da medida de absorbância de uma suspensão de células convertida em concentração de células (mg/mL). O fator de conversão foi calculado a partir da filtração de um volume adequado da suspensão de células em filtro Millipore (0,45 µm), posteriormente colocado para secar em estufa a 60 °C até atingir o peso constante (construção de uma curva de peso seco).

As células crescidas em meio YPD 2 % apresentam metabolismo fermentativo, utilizando a glicose presente no meio como única fonte de carbono e não dependendo do oxigênio como aceptor final dos elétrons. Já as células crescidas em meio YPD 0,5 %, devido à baixa repressão catabólica causada pela menor quantidade de glicose, fazem com que a levedura realize um metabolismo parcialmente respiratório. Estas condições metabólicas foram escolhidas para verificar a capacidade do extrato de *Spirulina platensis* no mimetismo da restrição calórica.

2.2.7 Curvas de peso seco

As curvas de peso seco foram realizadas com as cinco cepas da levedura *S. cerevisiae* a fim de obter, para cada uma delas, o fator de conversão de uma suspensão de células em concentração celular. O **Quadro 4** apresenta o modo de preparo das soluções para a realização das curvas de peso seco. As amostras foram preparadas em balões volumétricos de 50 mL, contendo solução padrão (YPD) com *S. cerevisiae*, nos volumes de (0, 2,5 mL, 5 mL, 7,5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 40 mL e 50 mL) e meio de cultivo YPD até completar 50 mL nos balões volumétricos. Após realizou-se a filtração ao vácuo das amostras em filtro milipore. Foram filtrados 25 mL de cada solução em papéis filtro numerados. Com o restante de solução dos balões volumétricos foram realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro a 570 nm, a fim de verificar a concentração de células. Após a filtração, os papeis filtro foram colocados em estufa à 60°C e pesados de hora em hora em balança analítica, até atingirem o peso constante. As curvas de peso seco foram construídas para cada cepa da levedura, a partir da concentração das soluções e do peso constante dos papeis filtro.

Quadro 4 Preparo das soluções para a realização das curvas de peso seco das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Balão volumétrico 50mL	Solução padrão (mL)	Meio de cultivo YPD (mL)
1	0	50
2	2,5	47,5
3	5	45
4	7,5	42,5
5	10	40
6	15	35
7	20	30
8	25	25
9	40	10
10	50	0

2.2.8 Delineamento experimental

O delineamento experimental realizado está apresentado no **Quadro 5**. Nos tratamentos, foram realizadas as concentrações de 0,8 mg/mL de extrato aquoso de *Spirulina platensis* e 200 mM de sulfato ferroso, de acordo com os testes citotóxicos realizados por Benetti (2013).

Quadro 5 Delineamento experimental para verificação do efeito da restrição calórica e do extrato aquoso de *Spirulina platensis* no cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Tratamentos	Cultivos
01	Padrão
02	Padrão + extrato de <i>Spirulina platensis</i>
03	Padrão + Íon Fe ²⁺
04	Padrão + extrato de <i>Spirulina platensis</i> + Íon Fe ²⁺
05	Restrição calórica
06	Restrição calórica + extrato de <i>Spirulina platensis</i>
07	Restrição calórica + Íon Fe ²⁺
08	Restrição calórica + extrato de <i>Spirulina platensis</i> + Íon Fe ²⁺

2.2.9 Simulação do envelhecimento cronológico

Após a realização dos tratamentos, as células foram submetidas ao processo de envelhecimento cronológico. Este consistiu na ressuspensão de aproximadamente 50 mg de células (obtidos a partir do cálculo da concentração mg/mL) de cada tratamento em 10 mL de água destilada, em erlenmeyer de 50 mL. As amostras foram incubadas a 37 °C em mesa agitadora ajustada para 160 rpm durante o período de 24 horas (ELEUTHERIO et al., 1995).

2.2.10 Preparação das amostras para análise de teor de oxidação de lipídios

As células tratadas foram lavadas duas vezes com água destilada gelada, ressuspensas em 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10 % e transferidas para tubos de parede grossa. Foram adicionadas 1,5 g de pérolas de vidro e o rompimento celular foi efetuado sob agitação vigorosa em 6 ciclos de 20 segundos em agitador tipo vórtex e 20 segundos no gelo. No rompimento celular manual com pérolas de vidro, a suspensão e as

pérolas são acondicionadas em tubos apropriados onde são vigorosamente agitadas, com auxílio de agitador de tubos, e após resfriadas.

O extrato obtido foi recolhido em tubos de ensaio e as pérolas de vidro lavadas com 500 μ L de TCA 10 %, recolhidas no mesmo tubo. Após a lise celular, os extratos foram centrifugados a 4000 rpm, e o sobrenadante foi coletado e utilizado para a análise de peroxidação lipídica.

2.2.11 Teor de oxidação de lipídios pelo método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

As análises realizadas conforme o protocolo de Steels, Learmonth e Watson (1994), utilizaram os extratos, EDTA 0,1 mol/L e ácido tiobarbitúrico 1% em NaOH 0,05 mol/L, conforme demonstrado no **Quadro 6**. A mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 minutos. Após os tubos foram resfriados e a absorbância medida a 532 nm.

Quadro 6 Composição das soluções para utilização na metodologia TBARS

	Branco (mL)	Amostra (mL)
Água destilada	0,3	-
EDTA 0,1 M	0,1	0,1
Extrato	-	0,3
Ácido Tiobarbitúrico 1% em NaOH	0,6	0,6
Volume total mL	1	1

O teor de oxidação de lipídios foi calculado através da **Equação 2**, sendo fator para obtenção da concentração de malonaldeído determinado a partir de uma curva analítica com padrão 1,1-3,3-tetrametoxipropano (TMP).

$$MDA = \frac{(Abs\ 532 \times f') \times 1000}{(Abs\ 570 \times f \times 100) \times 4,9 \times 0,15} \quad (2)$$

Onde:

MDA = concentração de malonaldeído (pmolesMDA/mg de células peso seco);

Abs 532 = absorvância medida no comprimento de onda de 532nm;

Abs 570 = absorvância medida no comprimento de onda de 570nm;

f' = fator obtido a partir da curva analítica com o padrão TMP;

f = fator obtido a partir da curva de peso seco da levedura;

100 = diluição realizada para medir a absorvância.

2.2.12 Curva padrão 1,1,3,3 tetrametoxipropano (TMP)

Foi construída uma curva padrão 1,1,3,3 tetrametoxipropano (TMP) a partir de 9 alíquotas (0,15 mL, 0,20 mL, 0,25 mL, 0,50 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 2,5 mL, 3,0 mL) originadas de uma solução com concentração de 0,2 mM. Cada alíquota foi colocada em balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com ácido tricloroacético a 10 %. Destas soluções, foram retiradas alíquotas de 5 mL, que foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados 5 mL de ácido 2-tiobarbitúrico a 0,02 M. Os tubos foram colocados em banho de água a 95 °C durante 15 minutos e posteriormente resfriados em banho de gelo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm e os valores obtidos foram utilizados para a construção de uma curva padrão.

2.2.13 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) pelo sistema de detecção adrenalina-citocromo

A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada medindo-se a velocidade de formação do composto adrenocromo, observada a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM, pH 10) e adrenalina (1 mM) (BOVERIS et al., 1983).

Para o ensaio, foi utilizada a metodologia desenvolvida por McCord e Fridovich (1969). As células previamente tratadas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato pH 7,0 e submetidas à lise celular pelo uso de esferas de vidro e 500 μ L tampão fosfato. Os extratos celulares foram obtidos por 3 ciclos de agitação em vórtex por 1 minuto, intercalados com 1 minuto no gelo. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi recolhido para as análises de atividade enzimática.

As análises foram realizadas em espectrofotômetro, utilizando-se 1 mL de tampão glicina e 17 μ L de sulfato de adrenalina para a construção da curva basal. Para as análises com as amostras, foram utilizados 1 mL de tampão glicina, 17 μ L de sulfato de adrenalina e 20, 40 ou 60 μ L de amostra, seguindo-se uma sequência de três avaliações. Os valores máximos e mínimos obtidos nas curvas foram utilizados para os cálculos dos resultados, expressos em unidades de SOD.

2.2.14 Análise dos dados

Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três repetições. As diferenças estatísticas foram verificadas utilizando-se análise de variância ANOVA e o teste de Tukey, a 5 % de significância ($p < 0,05$).

2.3 RESULTADOS

Os resultados dos ensaios de peroxidação lipídica, através do método TBARS, mostraram que existem diferenças significativas entre os genótipos investigados. Nas **Figuras 1-4** as letras (a, b) representam resultados significativamente distintos ($p < 0,05$).

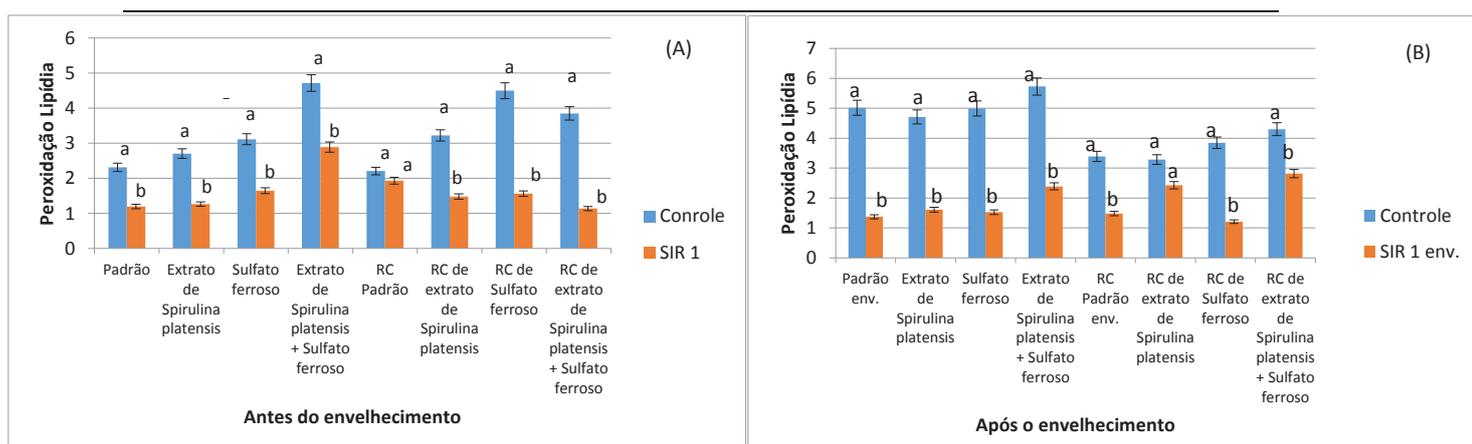


Figura 1 – Resultados da peroxidação lipídica celular de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e mutante *Sir1Δ* submetidas ou não aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis*; Sulfato ferroso; Extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso; RC; RC e extrato de *Spirulina platensis*; RC e sulfato ferroso; RC e extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso. A peroxidação lipídica foi medida antes e após o envelhecimento das células.

Inicialmente é imprescindível destacar que a cepa controle (BY4741) em comparação as demais cepas com deleções ao gene SIR, apresentou os maiores valores de peroxidação lipídica. Este resultado evidencia que a deleção do gene SIR é benéfica para a função celular. Após o envelhecimento, a cepa controle em condições normais de cultivo, apresentou aumento da peroxidação lipídica. Entretanto, quando estas células estão em RC (0,5% de glicose), após o envelhecimento a peroxidação lipídica é atenuada. O extrato de *S. platensis* é eficaz na proteção celular, mas não atua revertendo danos oxidativos.

Os resultados (**Figura 1**) da cepa deletada ao gene SIR 1 mostraram que o extrato de *S. platensis* apresentou valores semelhantes à terapia RC, antes do envelhecimento. No tratamento combinado de extrato de *S. platensis* juntamente com o sulfato ferroso foi possível perceber aumento da lipoperoxidação na cepa controle em relação ao tratamento da cepa SIR 1 com valores significativos ($p=0,04089$), entretanto, o extrato mostrou-se eficiente em atenuar o grau de lipoperoxidação celular.

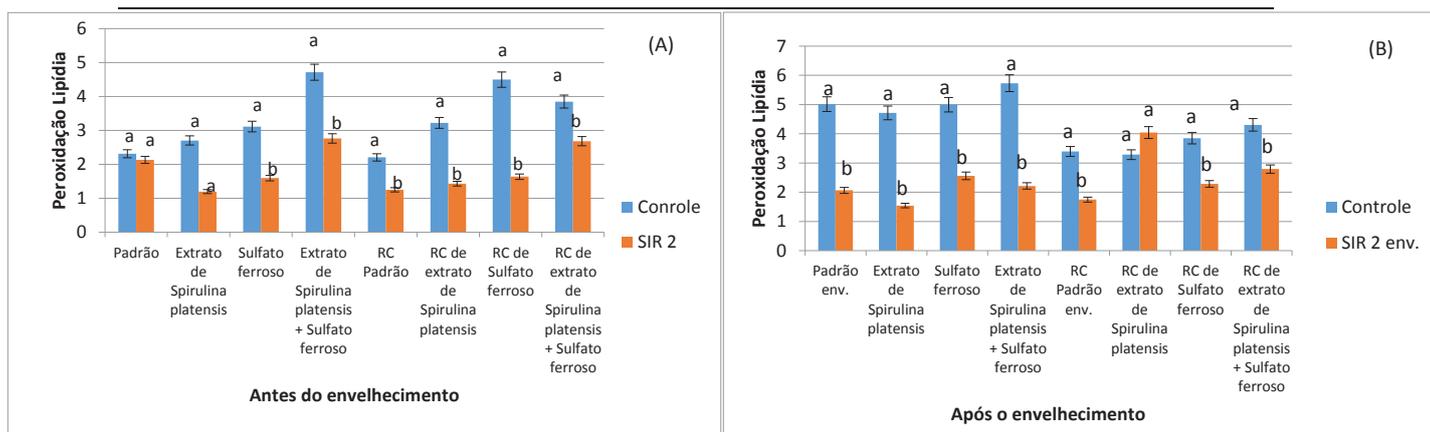


Figura 2 – Resultados da peroxidação lipídica celular de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e mutante *Sir2Δ* submetidas ou não aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis*; Sulfato ferroso; Extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso; RC; RC e extrato de *Spirulina platensis*; RC e sulfato ferroso; RC e extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso. A peroxidação lipídica foi medida antes e após o envelhecimento das células.

Na **Figura 2**, a cepa deletada ao gene SIR 2 com a terapia antioxidante extrato de *S. platensis* apresentou resultados semelhantes à terapia RC, antes e após o envelhecimento. No entanto, após o envelhecimento das células, quando as terapias foram associadas, a peroxidação mostrou leve tendência ao aumento, o que sugere efeito pró-oxidante. Nas amostras submetidas ao envelhecimento e deletadas ao gene SIR2, o extrato de *Spirulina* mostrou-se efetivo em proteger as células contra a peroxidação celular. Observou-se uma diminuição a a peroxidação lipídica na proporção de 23,17% para o extrato de *S. platensis* em relação ao tratamento padrão da cepa SIR 2.

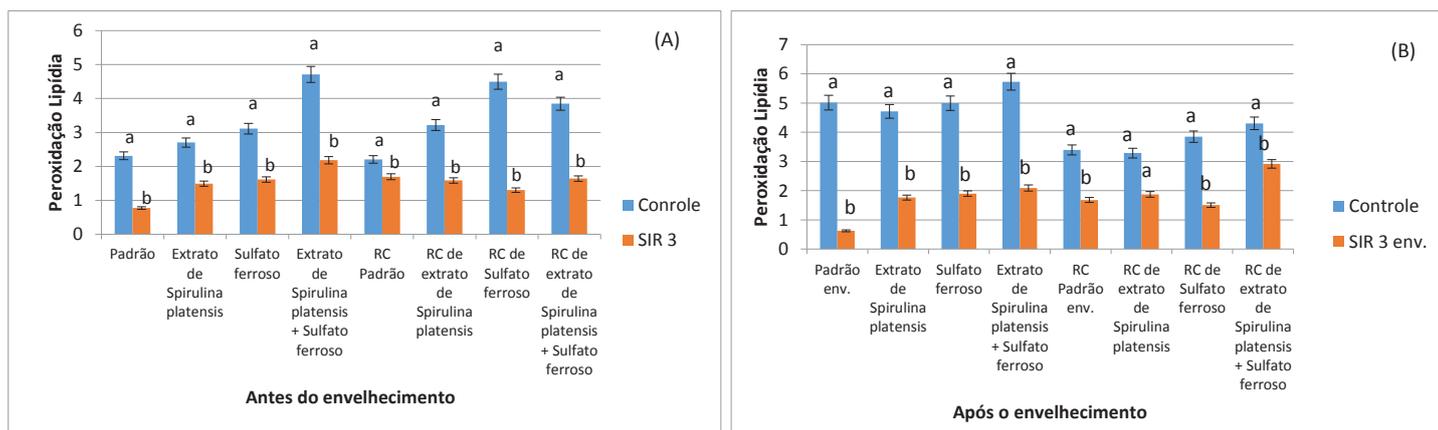


Figura 3 – Resultados da peroxidação lipídica celular de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e mutante *Sir3Δ* submetidas ou não aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis*; Sulfato ferroso; Extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso; RC; RC e extrato

de *Spirulina platensis*; RC e sulfato ferroso; RC e extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso. A peroxidação lipídica foi medida antes e após o envelhecimento das células.

Na **Figura 3** observou-se o potencial da terapia com o extrato de *S. platensis* em imitar os resultados da terapia RC na cepa mutante. O extrato de *S. platensis* não foi efetivo na proteção celular da cepa mutante *Sir3Δ*.

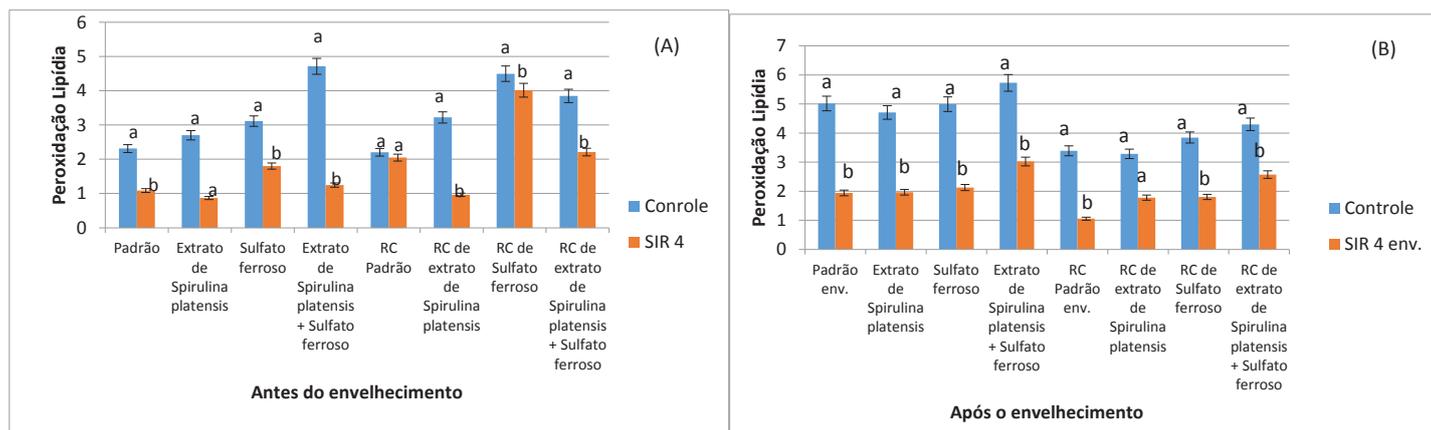


Figura 4 – Resultados da peroxidação lipídica celular de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e mutante *Sir4Δ* submetidas ou não aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis*; Sulfato ferroso; Extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso; RC; RC e extrato de *Spirulina platensis*; RC e sulfato ferroso; RC e extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso. A peroxidação lipídica foi medida antes e após o envelhecimento das células.

Na **Figura 4** o extrato de *S. platensis* associado com a RC, na cepa deletada ao gene SIR 4, atenuou a peroxidação lipídica ($p=0,031166$). Além disso, ocorreu uma variação de 70,19% em relação a cepa controle no mesmo tratamento. Observou-se que antes do envelhecimento da levedura, o extrato de *S. platensis* foi mais efetivo que a RC.

Os ensaios enzimáticos realizados a partir da dosagem da superóxido dismutase são apresentados nas **Figuras 5-8**, sendo que as letras (a, b) mostram resultados significativos ($p \leq 0,05$).

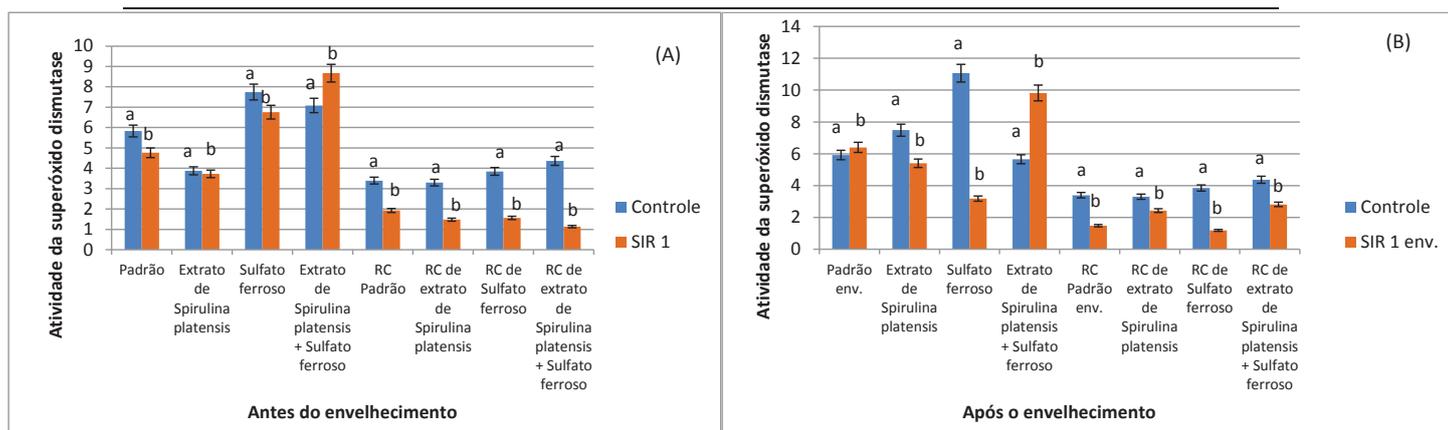


Figura 5 – Resultados da dosagem da atividade enzimática de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e mutante *Sir1Δ* submetidas ou não aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis*; Sulfato ferroso; Extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso; RC; RC e extrato de *Spirulina platensis*; RC e sulfato ferroso; RC e extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso. A atividade da superóxido dismutase foi medida antes e após o envelhecimento das células.

A partir dos resultados da dosagem enzimática (**Figuras 5-8**), constatou-se que a terapia RC foi eficaz na diminuição da atividade SOD em todas as cepas estudadas, antes e após o envelhecimento das células. Observou-se também que o envelhecimento não modificou o padrão de atividade da enzima dosada.

A **Figura 5** evidencia a capacidade do extrato de *S. platensis* em diminuir a atividade da enzima SOD, em ambas as cepas e antes do envelhecimento. Na cepa controle a comparação entre as médias dos tratamentos padrão e extrato de *S. platensis* evidenciou a redução da atividade SOD igual a 33,68%. Também ocorreu variação na cepa deletada ao gene SIR 1 entre os mesmos tratamentos com redução de 21,64%. Na cepa deletada ao gene SIR 1, a associação do extrato de *S. platensis* com o sulfato ferroso elevou a atividade enzimática antes do envelhecimento em 83,30%, em comparação ao padrão. Na cepa controle também foi observado o mesmo efeito nos tratamentos com aumento da atividade SOD em 21,44%.

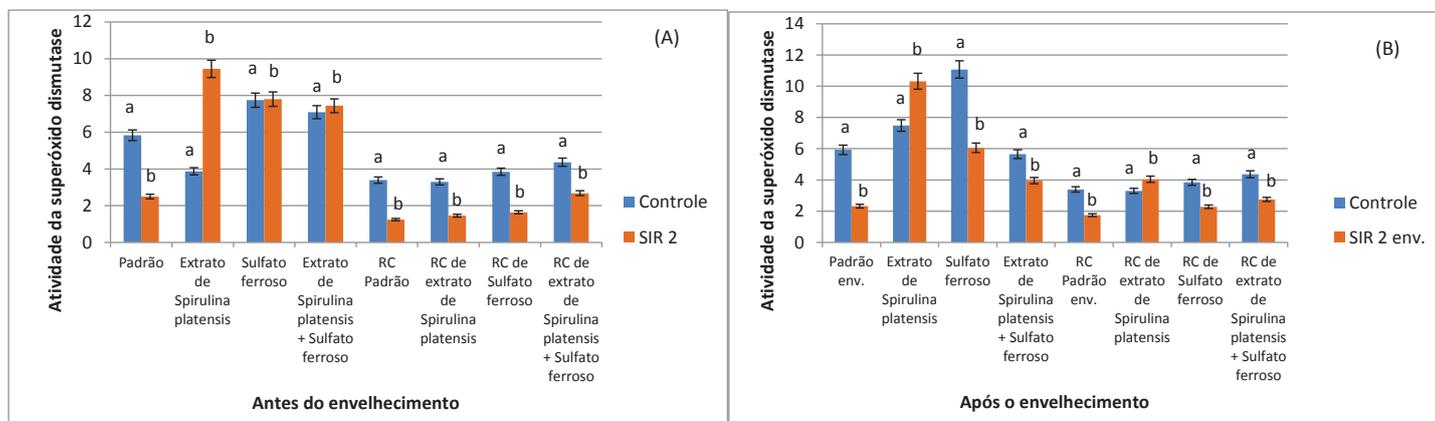


Figura 6 – Resultados da dosagem da atividade enzimática de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e mutante *Sir2Δ* submetidas ou não aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis*; Sulfato ferroso; Extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso; RC; RC e extrato de *Spirulina platensis*; RC e sulfato ferroso; RC e extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso. A atividade da superóxido dismutase foi medida antes e após o envelhecimento das células.

Na **Figura 6** notou-se um aumento na atividade SOD da cepa deletada ao gene SIR 2 tratada com extrato de *S. platensis*, em condições normais de cultivo, antes e após o envelhecimento das células. O aumento da atividade SOD observado entre a cepa controle e a cepa deletada ao gene SIR 2 no tratamento com extrato de *S. platensis* antes do envelhecimento ($p=0,034674$) e após o envelhecimento ($p=0,035943$), com resultados significativos. Na cepa SIR 2 antes do envelhecimento observou-se uma variação entre o padrão e o extrato de *S. plantensis* de 279, 52%. Após o envelhecimento a variação entre estes tratamentos foi de 344,83%.

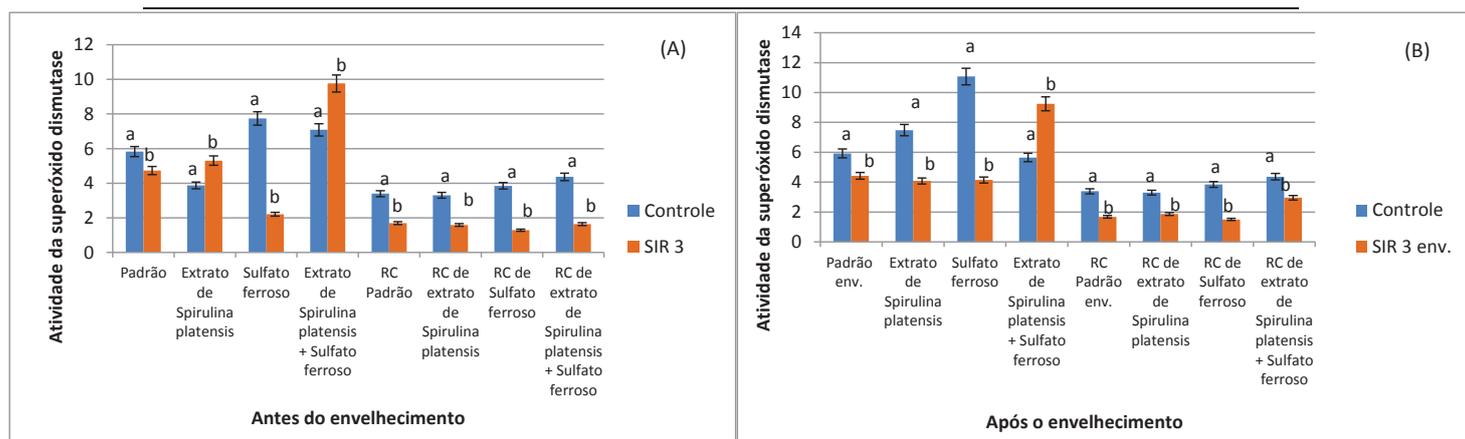


Figura 7 – Resultados da dosagem da atividade enzimática de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e mutante *Sir3Δ* submetidas ou não aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis*; Sulfato ferroso; Extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso; RC; RC e extrato de *Spirulina platensis*; RC e sulfato ferroso; RC e extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso. A atividade da superóxido dismutase foi medida antes e após o envelhecimento das células.

Na **Figura 7** observou-se um aumento na atividade SOD da cepa deletada ao gene *SIR 3* tratada com extrato de *S. platensis* e sulfato ferroso, em condições normais de cultivo, antes e após o envelhecimento das células. Na cepa deletada ao gene *SIR 3*, o tratamento padrão comparado ao tratamento extrato de *S. platensis* e sulfato ferroso apresentou variações de 109, 05%, antes o envelhecimento e após o envelhecimento igual a 106,34%.

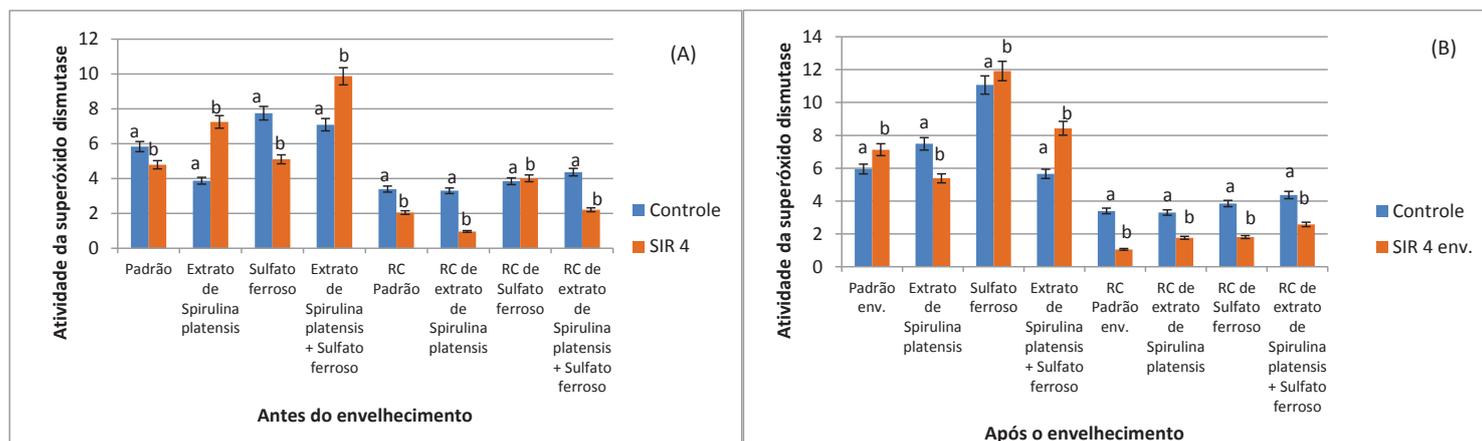


Figura 8 – Resultados da dosagem da atividade enzimática de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e mutante *Sir4Δ* submetidas ou não aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis*; Sulfato ferroso; Extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso; RC; RC e extrato de *Spirulina platensis*; RC e sulfato ferroso; RC e extrato de *Spirulina platensis* + sulfato ferroso. A atividade da superóxido dismutase foi medida antes e após o envelhecimento das células.

Na **Figura 8** a associação das terapias (RC e extrato de *S. platensis*), antes do envelhecimento das células deletadas ao gene SIR 4, propiciou a diminuição da atividade SOD ($p=0,045529$). Após o envelhecimento, a atividade da enzima foi maior na cepa SIR 4 nos tratamentos padrão, com sulfato ferroso e com extrato de *S. platensis* e sulfato ferroso, mas diminuiu no tratamento com extrato de *S. platensis*.

2.4 DISCUSSÃO

O ferro utilizado como agente estressor neste estudo, participa de reações de oxirredução (onde Fe^{3+} sofre redução Fe^{2+} e Fe^{2+} sofre oxidação Fe^{3+} e 1 elétron) e condiciona o estresse celular que gera uma diminuição na taxa de crescimento e na atividade metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*. Diante disso, os antioxidantes da dieta desempenham um importante papel na proteção das células e no restabelecimento celular após o estresse induzido.

A membrana é um dos componentes da célula mais susceptíveis à ação dos radicais livres em decorrência da peroxidação lipídica e suas ações deletérias, que alteram a estrutura e a permeabilidade da membrana e originam produtos altamente tóxicos como o malonaldeído. As terapias foram eficazes na atenuação da peroxidação lipídica e, portanto, atuaram na proteção celular.

A relação entre restrição calórica e longevidade, revela que o mecanismo energético pode contribuir para atenuação do envelhecimento. O metabolismo celular oxidativo da levedura ocorre na presença de oxigênio e são oxidados os carboidratos por respiração. As sirtuínas, produtos do gene SIR, são ativadas durante a restrição calórica e tem como coenzima a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+). Com a ativação das sirtuínas a homeostase metabólica é modulada.

A síntese das enzimas sirtuínas é ativada pelo substrato e elas apresentam mecanismos de proteção do genoma em condições de estresse. Acredita-se que a levedura com o gene SIR deletado não possui essa proteção. Os resultados dos testes TBARS

mostraram que as deleções foram benéficas para a função celular, pois ocorreu atenuação da peroxidação lipídica nas cepas deletadas em comparação a cepa controle.

Tsuchiya e cols. (2006) demonstraram que o tempo de vida da levedura mutante *fob1Δ sir2Δ hst1Δ hst2Δ hst3Δ hst4Δ* foi extremamente curto, indicando que a ausência completa de atividade das sirtuínas é prejudicial para a função celular. Apesar disso, a RC aumentou significativamente o tempo de vida das células *fob1Δ sir2Δ hst1Δ hst2Δ hst4Δ*.

A partir dos resultados da atividade SOD, percebeu-se que o uso de terapias antioxidantes inibiu a síntese da enzima, que não se fez necessária. Esse entendimento pode explicar porque alguns antioxidantes em determinadas concentrações se tornam pró-oxidantes.

Na literatura, os estudos experimentais que combinam sirtuínas e RC em leveduras, destacam o gene SIR2 que possui homólogos em células de mamíferos (KAEBERLEIN et al., 2002; KAEBERLEIN et al., 2004; ANDERSON et al., 2003a; ANDERSON et al., 2003b; HOWITZ et al., 2003; AGARWAL et al., 2005; TSUCHIYA et al., 2006; LU; KATO; LIN, 2009; RAHAT; MAOZ; COHEN, 2011; SALVI et al., 2013).

A terapia RC foi capaz de atenuar a peroxidação lipídica celular e diminuir a atividade da enzima superóxido dismutase. Agarwal e cols (2005), testaram a sensibilidade de células de levedura ao estresse oxidativo externo em condições normais e de restrição calórica, com uso dos estressores peróxido de hidrogênio e paraquat. Os resultados indicaram que as células cultivadas em RC foram mais sensíveis ao estresse oxidativo exterior. Os nossos resultados mostraram que as células em RC diminuíram a produção de radicais livres, pois atenuaram o estresse oxidativo celular.

Centenaro e cols. (2010), utilizando ratos como modelo experimental observaram os efeitos das terapias RC e ficocianina (pigmento da *Spirulina platensis*), no envelhecimento dos animais. Ambas as terapias utilizadas de forma isolada atenuaram os danos oxidativos celulares. No entanto, quando associadas, as terapias provocaram efeito pró-oxidante. Na presente pesquisa a ação sinérgica da RC com o extrato de *Spirulina platensis* provocou um aumento significativo na peroxidação lipídica do mutante *Sir2Δ*, após o envelhecimento das células, sugerindo um efeito pró-oxidante celular.

Howitz e cols. (2003) investigaram possíveis ativadores de sirtuínas e descobriram que o resveratrol (2-5 mM de concentração) favorece o aumento da expectativa de vida da levedura. Além disso, estes autores desenvolveram experimentos com resveratrol e RC. Observaram que a RC não aumentou o tempo de vida da levedura tratada com resveratrol, indicando que provavelmente o resveratrol age através da mesma via da restrição calórica. Consistente com isto, o resveratrol não teve nenhum efeito sobre o tempo de vida de um mutante deletado ao gene SIR 2. Os nossos resultados, mostraram que o extrato de *Spirulina platensis* tem efeitos benéficos na manutenção da função celular do mutante deletado ao gene SIR2, conforme visualizado na Figura 2.

Na presente pesquisa, o extrato de *Spirulina platensis* atuou na proteção celular. Os estudos de Chu et al. (2010), Guarienti, Costa e Bertolin (2010) e Bertolin et al. (2011b), também evidenciaram o potencial do extrato de *S. platensis* na atenuação do estresse oxidativo.

O envelhecimento é caracterizado pela desregulação dos sistemas biológicos e pelos danos que ocorrem no organismo, com destaque para o estresse oxidativo celular. As sirtuínas são capazes de promover a longevidade, pois regulam funções específicas, incluindo funções cardiovasculares e neurológicas (KELLY, 2010; DONMEZ et al., 2012). Nossos resultados podem ser relacionados com a capacidade de neuroproteção, visto que as sirtuínas têm sido estudadas como bloqueadoras da lesão neuronal.

2.5 CONCLUSÃO

A deleção dos genes SIR 1, 2, 3 e 4 foi benéfica para a função celular, pois diminuiu a peroxidação lipídica antes e após o envelhecimento das células, em comparação com a cepa controle. O extrato de *Spirulina platensis* foi efetivo na proteção celular, mas não atuou revertendo danos oxidativos induzidos por sulfato ferroso. A terapia restrição calórica minimizou a atividade da enzima superóxido dismutase, evidenciando que o metabolismo interfere na proteção celular.

REFERÊNCIAS

AFANAS'EV, I. Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging - Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. **Aging and disease**, v. 1, n. 2, p. 75-88, 2010.

AGARWAL, S. et al. Caloric restriction augments ROS defense in *S. cerevisiae*, by a Sir2p independent mechanism. **Free Radical Research**, v. 39, n. 1, p. 55-62, Jan. 2005.

ANDERSON, R. M. et al. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 432, p. 181-185, May 2003a.

ANDERSON, R. M. et al. Yeast life-span extension by calorie restriction is independent of NAD fluctuation. **Science**, v. 302, p. 2124-2126, 2003b.

BENEDETTI, S. et al. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Life Sciences**, v. 75, p. 2353-2362, 2004.

BENNETT, A. BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58 n. 2, p. 419-435, aug. 1973.

BENETTI, F. **Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene sir2**. 2013. 232f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

BERTOLIN, T. E. et al. Antioxidant Effect of Phycocyanin on Oxidative Stress Induced with Monosodium Glutamate in Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54 n. 4, p. 733-738, July/Aug. 2011.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 1, p. 20-25, 2000.

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated-rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 227, p. 534-541, 1983.

CABANTCHIK, Z. I. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1-11, Mar. 2014.

CENTENARO, A. et al. Restrição calórica e ficocianina no processo do envelhecimento de ratos. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, Passo Fundo, v. 7, supl. 1, p. 80-89, 2010.

CHU, W. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 10, n. 53, p. 1-8, 2010.

COSTA, J. A. V. et al. Purification of *Spirulina platensis* Phycocyanin. **Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard**, v. 14, p. 63-64, 2005.

DONMEZ, G. et al. SIRT1 Protects against α -Synuclein Aggregation by Activating Molecular Chaperones. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p.124 –132, Jan. 2012.

ECHEVERRI-RUÍZ, N. P.; MOCKUS-SIVICKAS, I. Mecanismos celulares en respuesta al estrés: sirtuinas. **Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia**, v. 58, n. 3, p. 221-232, 2010.

ELEUTHERIO, E. C. A. et al. Effect of trehalose during stress conditions in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 36, p. 1217-1223, 1995.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. 64, p. 1-21, jun. 2012.

FERNANDEZ, L. L. et al. Ferro e neurodegeneração. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 218-224, out./dez., 2007.

FINKEL, T. A toast to long life. **Nature**, v. 425, p. 132, Sept. 2003.

GUARIENTI, C.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor Paraquat. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.1, p. 106-111, 2010.

HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* Lifespan. **Nature**, v. 425, p. 191-196, Sept. 2003.

KAEBERLEIN, M. et al. High Osmolarity Extends Life Span in *Saccharomyces cerevisiae* by a Mechanism related to calorie restriction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 22, p.8056-8066, Nov. 2002.

KAEBERLEIN, M. et al. Sir2-Independent Life Span Extension by Calorie Restriction in Yeast. **PLoS Biology**, v. 2, n. 9, p. 296, 2004.

KELLY, G. S. A Review of the Sirtuin System, its Clinical Implications, and the Potential Role of Dietary Activators like Resveratrol: Part 1. **Alternative Medicine Review**, v.15, n.4, p. 313-328, 2010.

LU, S.; KATO, M.; LIN, S. Assimilation of Endogenous Nicotinamide Riboside Is Essential for Calorie Restriction-mediated Life Span Extension in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 25, p. 17110–17119, Jun. 2009.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MERKSAMER, P. I. et al. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. **Aging**, v. 5, n. 3, p. 144-150, Mar. 2013.

RAHAT, O.; MAOZ, N.; COHEN, H. Y. Multiple Pathways Regulating the Calorie Restriction Response in Yeast. **Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES**, v. 66A, n. 2, p. 163–169, Feb. 2011.

RAHMAN, S.; ISLAM, R. Mammalian Sirt1: insights on its biological Functions. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 11, p. 1-8, 2011.

SALVI, J. S. et al. Enforcement of a lifespan-sustaining distribution of Sir2 between telomeres, mating-type loci, and rDNA repeats by Rif1. **Aging Cell**, v. 12, p. 67–75, 2013.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology**, v. 140, 569-576, 1994.

TSUCHIYA, M. et al. Sirtuin-independent effects of nicotinamide on lifespan extension from calorie restriction in yeast. **Aging Cell**, v. 5, p. 505–514, 2006.

VÍLCHEZ, C. et al. Microalgae-mediated chemicals production and waste removal. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 8, p. 562-572, Jun. 1997.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O entendimento acerca das mudanças metabólicas provocadas pelo íon ferroso e pelas terapias RC e extrato de *Spirulina platensis* está sendo construído. Com este trabalho esperamos contribuir de alguma forma para a elucidação do papel das terapias empregadas e possibilitar ações terapêuticas futuras, além de desenvolver esta linha de pesquisa.

Ao concluir este estudo apontamos que o efeito das terapias restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* são importantes para a proteção celular. Os resultados da dosagem enzimática mostram a capacidade da terapia RC em atenuar a atividade da enzima superóxido dismutase em todas as cepas estudadas, antes e após o envelhecimento das células. A enzima não foi necessária, sendo a RC considerada a terapia mais efetiva. Além disso, a ausência das sirtuínas beneficiou as células, com a atenuação da peroxidação lipídica e o extrato de *Spirulina platensis* foi eficaz na proteção celular, mas não atuou revertendo o dano oxidativo induzido por sulfato ferroso.

Desta forma, a realização de estudos futuros poderão aprimorar os presentes achados a partir da ampliação dos experimentos com técnicas enzimáticas e de viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

AFANAS'EV, I. Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging - Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. **Aging and disease**, v. 1, n. 2, p. 75-88, 2010.

AGARWAL, S. et al. Caloric restriction augments ROS defense in *S. cerevisiae*, by a Sir2p independent mechanism. **Free Radical Research**, v. 39, n. 1, p. 55-62, Jan. 2005.

ANDERSON, R. M. et al. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 432, p. 181-185, May 2003a.

ANDERSON, R. M. et al. Yeast life-span extension by calorie restriction is independent of NAD fluctuation. **Science**, v. 302, p. 2124-2126, 2003b.

ARSLAN-ERGUL, A.; OZDEMIR, T.; ADAMS, M. M. Aging, Neurogenesis, and Caloric Restriction in Different Model Organisms. **Aging and Disease**, v. 4, n. 4, p. 221-232, Aug. 2013.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENEDETTI, S. et al. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Life Sciences**, v. 75, p. 2353-2362, 2004.

BENETTI, F. **Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene sir2**. 2013. 232f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

BENNETT, A. BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58 n. 2, p. 419-435, aug. 1973.

BERMEJO, P. B.; PINERO, E. P.; VILLAR, A. M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p.1496–1502, 2008.

BERTOLIN, T. E. et al. Efeito antioxidante da ficocianina em pescado salgado-seco. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 4, p. 751-757, jul./ago. 2011a.

BERTOLIN, T. E. et al. Antioxidant Effect of Phycocyanin on Oxidative Stress Induced with Monosodium Glutamate in Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54 n. 4, p. 733-738, July/Aug. 2011b.

BERTOLIN, T. E. et al. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1253-1259, 2009.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 1, p. 20-25, 2000.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago., 1999.

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated-rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 227, p. 534-541, 1983.

CABANTCHIK, Z. I. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1-11, Mar. 2014.

CAVALCANTE, A. G. M.; BRUIN, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 35, n.12, p. 1227-1237, 2009.

CENTENARO, A. et al. Restrição calórica e ficocianina no processo do envelhecimento de ratos. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, Passo Fundo, v. 7, supl. 1, p. 80-89, 2010.

CHU, W. et al. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 10, n. 53, p. 1-8, 2010.

COSTA, J. A. V. et al. Purification of *Spirulina platensis* Phycocyanin. **Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard**, v. 14, p. 63-64, 2005.

COZZA, K. L. ***Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos experimentais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 1999.

DONMEZ, G. et al. SIRT1 Protects against α -Synuclein Aggregation by Activating Molecular Chaperones. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p.124 –132, Jan. 2012.

ECHEVERRI-RUÍZ, N. P.; MOCKUS-SIVICKAS, I. Mecanismos celulares en respuesta al estrés: sirtuinas. **Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia**, v. 58, n. 3, p. 221-232, 2010.

ELEUTHERIO, E. C. A. et al. Effect of trehalose during stress conditions in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 36, p. 1217-1223, 1995.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. 64, p. 1-21, jun. 2012.

FERNANDEZ, L. L. et al. Ferro e neurodegeneração. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 218-224, out./dez., 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINKEL, T. A toast to long life. **Nature**, v. 425, p. 132, Sept. 2003.

FRIES, A. T.; PEREIRA, D. C. Teorias do envelhecimento humano. **Revista Contexto & Saúde**, Ijuí, v. 10, n. 20, p. 507-514, Jan./Jun. 2011.

GARSKE, A. L.; SMITH, B. C.; DENU, J. M. Linking SIRT2 to Parkinson's disease. **ACS Chemical Biology**, v. 2, n. 8, p. 529-532, 2007.

GRANDI, R. A. P. (Trad.). Fungos. In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 297-335.

GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor Paraquat. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.1, p. 106-111, 2010.

HARMAN, D. The free radical theory of aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.5, n. 5, p. 557-561, Oct. 2003.

HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* Lifespan. **Nature**, v. 425, p. 191-196, Sept. 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Idoso no mundo**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/datas/idoso/idoso_no_mundo.html>. Acesso em: 20 out. 2013.

KACHAR, V. Envelhecimento e perspectivas de inclusão digital. **Revista Kairós Gerontologia**, v.13, n. 2, p. 131-147, nov. 2010.

KAEBERLEIN, M. et al. High Osmolarity Extends Life Span in *Saccharomyces cerevisiae* by a Mechanism related to calorie restriction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 22, p.8056-8066, Nov. 2002.

KAEBERLEIN, M. et al. Sir2-Independent Life Span Extension by Calorie Restriction in Yeast. **PLoS Biology**, v. 2, n. 9, p. 296, 2004.

KELLY, G. S. A Review of the Sirtuin System, its Clinical Implications, and the Potential Role of Dietary Activators like Resveratrol: Part 1. **Alternative Medicine Review**, v.15, n.4, p. 313-328, 2010.

KIRKHAM P, RAHMAN I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology Therapeutics**, v. 111, n. 2, p. 476-94, 2006.

LEE, S.; MIN, K. Caloric restriction and its mimetics. **BMB Reports**, v. 46, n. 4, p. 181-7, Apr. 2013.

LIBERT, S.; GUARENTE, L. Metabolic and Neuropsychiatric Effects of Calorie Restriction and Sirtuins. **Annual Review of Physiology**, v. 10, n. 75, p. 669–684, Feb. 2013.

LÜ, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular of Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LU, S.; KATO, M.; LIN, S. Assimilation of Endogenous Nicotinamide Riboside Is Essential for Calorie Restriction-mediated Life Span Extension in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 284, n. 25, p. 17110–17119, Jun. 2009.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, v. 1, n. 6, p. 441-445, 1987.

MATTSON, J. A. et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 318-321, 2012.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MERKSAMER, P. I. et al. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, v. 5, n. 3, p. 144-150, Mar. 2013.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

NETTO, F. L. de M. Aspectos biológicos e fisiológicos do envelhecimento humano e suas implicações na saúde do idoso. **Pensar a Prática**, v. 7, p. 75-84, Mar. 2004.

OLIVEIRA, R. M.; PAIS, T. F.; OUTEIRO, T. F. Sirtuins: common targets in aging and in neurodegeneration. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 10, p. 1270-80, Oct. 2010.

OUTEIRO, T. F. et al. Sirtuin 2 Inhibitors Rescue α -Synuclein-Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease. **Science**, v. 317, p. 516-519, Jul. 2007.

OUTEIRO, T. F.; LINDQUIST, S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1772-1775, 2003.

PAPAS, A. M. Diet and antioxidant status. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 999-1007, 1999.

PATEL, M.; RAMAVATARAM, D. V. S. S. Non Transferrin Bound Iron: Nature, Manifestations and Analytical Approaches for Estimation. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 322-332, Oct.-Dec. 2012.

RAHAT, O.; MAOZ, N.; COHEN, H. Y. Multiple Pathways Regulating the Calorie Restriction Response in Yeast. **Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES**, v. 66A, n. 2, p. 163–169, Feb. 2011.

RAHMAN, S.; ISLAM, R. Mammalian Sirt1: insights on its biological Functions. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 11, p. 1-8, 2011.

RAMOS, C. L. et al. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 935-944, 2013.

RATTAN, S. I. S. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. **Free Radicals Research**, v. 40, n. 12, p. 1230-1238, 2006.

ROCHA, F. D. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 4, p. 631-639, 2007.

SALVI, J. S. et al. Enforcement of a lifespan-sustaining distribution of Sir2 between telomeres, mating-type loci, and rDNA repeats by Rif1. **Aging Cell**, v. 12, p. 67–75, 2013.

SILVA, C. G. da et al. Protective effects of flavonoids and extract from *Vellozia kolbekii* Alves against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in yeast. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, p. 367–372, 2012.

SILVA, W. J. M. da; FERRARI, C. K. B. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology**, v. 140, 569-576, 1994.

SULTANA, R.; PERLUIGI, M. BUTTERFIELD, A. D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 62, p. 157-169, 2013.

TEIXEIRA, I. N. D. O.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 6, p. 2845-2857, 2010.

TSUCHIYA, M. et al. Sirtuin-independent effects of nicotinamide on lifespan extension from calorie restriction in yeast. **Aging Cell**, v. 5, p. 505–514, 2006.

VERAS, R. P. Um modelo em que todos ganham: mudar e inovar, desafios para o enfrentamento das doenças crônicas entre os idosos. **Acta Scientiarum Human and Social Sciences**, Maringá, v. 34, n. 1, p. 3-8, Jan.-June, 2012.

VÍLCHEZ, C. et al. Microalgae-mediated chemicals production and waste removal. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 8, p. 562-572, Jun. 1997.

ANEXOS

Anexo A. Comprovante de submissão

ESTUDOS INTERDISCIPLINARES SOBRE O ENVELHECIMENTO

[CAPA](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#) [PESQUISA](#) [ATUAL](#) [ANTERIORES](#) [NOTÍCIAS](#)

[Capa](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões Ativas](#)

SUBMISSÕES ATIVAS

ATIVO [ARQUIVO](#)

ID	MM-DD ENVIADO	SEÇÃO	AUTORES	TÍTULO	SITUAÇÃO
46596	24-04	ART	Becegatto, Ore, Costa, Bertolin	RESTRIÇÃO CALÓRICA E EXTRATO DE SPIRULINA PLATENSIS...	Aguardando designação

1 a 1 de 1 itens

INICIAR NOVA SUBMISSÃO

[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de submissão.

Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento. ISSN: 1517-2473 (impresso) e 2316-2171 (eletrônico)
Qualis Capes 2013, área interdisciplinar: B1

[Ajuda do sistema](#)

USUÁRIO

Logado como:
marcolegh
[Meus periódicos](#)
[Perfil](#)
[Sair do sistema](#)

CONTEÚDO DA REVISTA

Pesquisa

Todos

[Procurar](#)

[Por Edição](#)

[Por Autor](#)

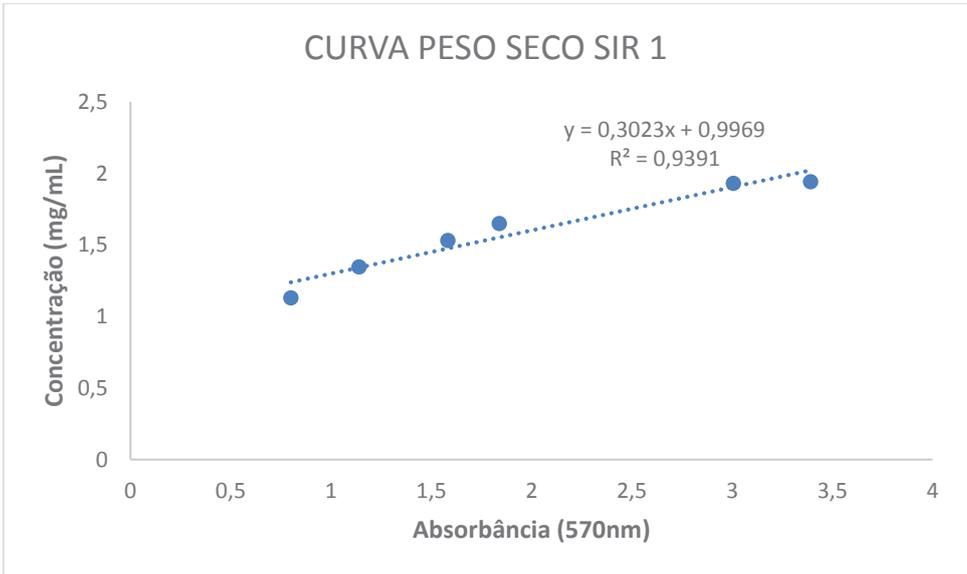
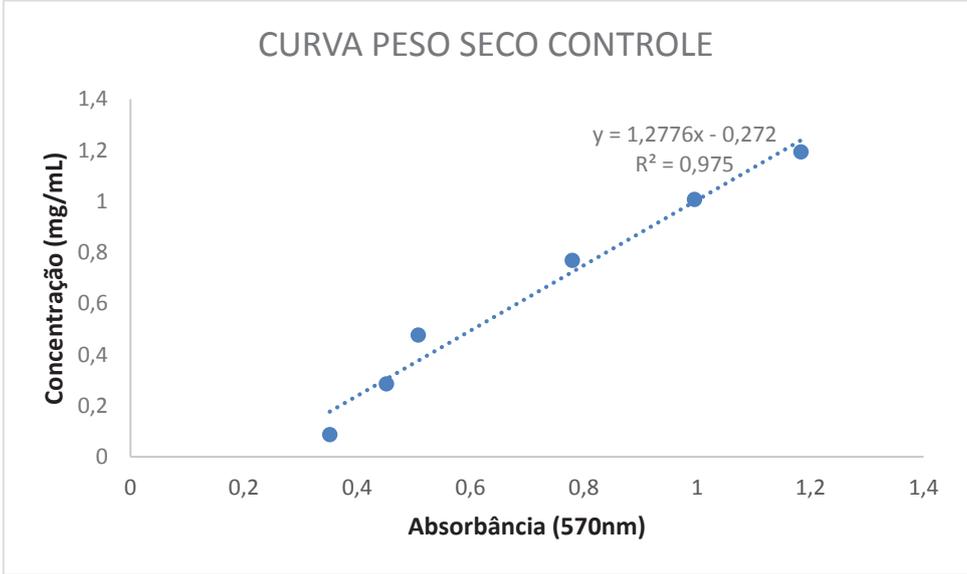
[Por título](#)

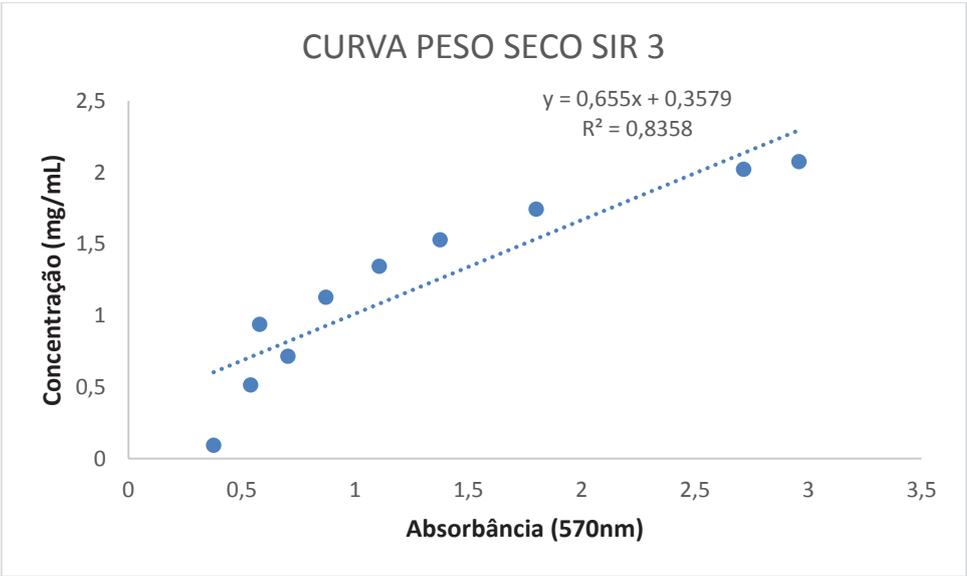
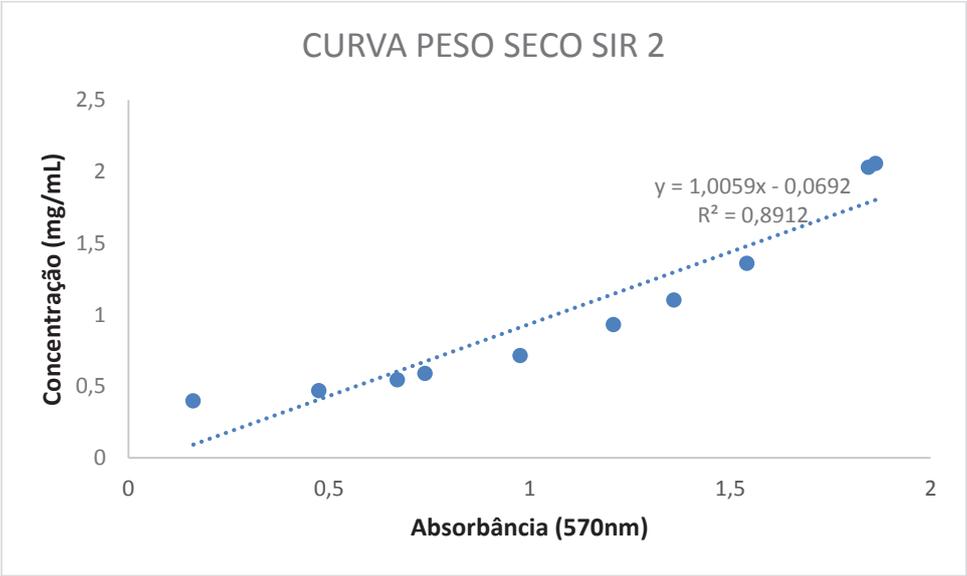
[Outras revistas](#)

TAMAMHO DE FONTE

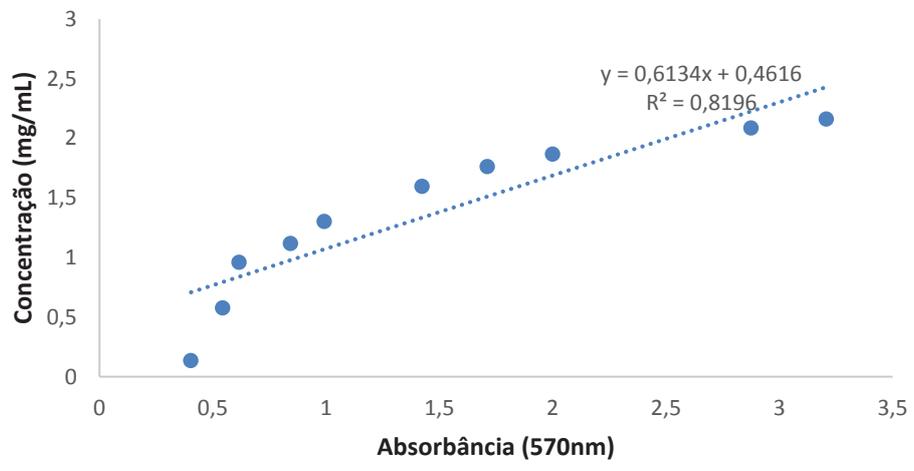
APÊNDICES

Apêndice A. Curvas de peso seco.



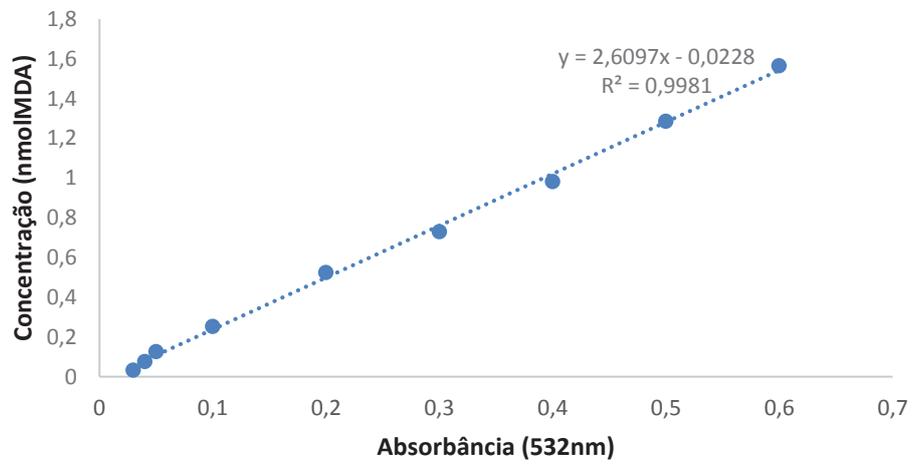


CURVA PESO SECO SIR 4



Apêndice B. Curva Analítica com padrão 1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano (TMP).

CURVA TMP



Apêndice C. Projeto de pesquisa.

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Educação Física e Fisioterapia
Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano

Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir1*

Marcela Geisa Becegato

Passo Fundo, março de 2013.

1 Dados de identificação

1.1 Título

Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir1*.

1.2 Autor

Marcela Geisa Becegatto, Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (2011); Mestranda bolsista do Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo; e-mail: marcelabecegatto@yahoo.com.br.

1.3 Orientador

Telma Elita Bertolin, Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade de Passo Fundo (1985); Mestre em Ciências e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas (1990); Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Universidade de São Paulo (1997); Professora do Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo; e-mail: telma@upf.br.

1.4 Duração

O mestrado terá duração máxima de 24 meses, sendo que o período para a realização dos experimentos está previsto para 7 meses.

1.5 Vigência

A pesquisa iniciará no mês de março de 2013 e estender-se-á até setembro de 2013.

2 Resumo

O processo de envelhecimento humano está associado com alterações na funcionalidade de células, tecidos e órgãos, mas também com a redução da eficácia de um conjunto de sistemas fisiológicos. O acúmulo progressivo de alterações gera crescente suscetibilidade

a doenças que acompanham o avançar da idade. Danos oxidativos em biomoléculas e o acúmulo de ferro em áreas do cérebro podem causar doenças neurodegenerativas. Para atuar na redução do estresse oxidativo e evitar os danos causados pelo acúmulo de ferro poderia se fazer uso de terapias com antioxidantes naturais. A utilização de terapias antioxidantes vem recebendo destaque na atualidade, visto que sugerem uma relação inversa entre o seu uso e a incidência de doenças. A cianobactéria *Spirulina platensis* destaca-se na literatura científica por apresentar propriedades funcionais, como antioxidante natural, verificada em modelos *in vivo* e *in vitro*. Outra terapia muito discutida atualmente é a restrição calórica (RC), que apresenta efeitos determinantes na longevidade mediada pela indução do gene Silent Information Regulator (SIR). No presente estudo, as células de *Saccharomyces cerevisiae* tipo selvagem e deletadas ao gene SIR 1 serão expostas aos tratamentos: (1) padrão; (2) com ferro; (3) com extrato de *S. platensis*; (4) com ferro + extrato de *S. platensis* e analisadas quanto à viabilidade celular via técnica de plaqueamento, danos oxidativos pela peroxidação lipídica e atividade da superóxido dismutase (SOD). Neste contexto, objetiva-se avaliar o potencial antioxidante do extrato de *Spirulina platensis* e o efeito da RC em *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ao estressor Fe^{2+} , em testes com e sem envelhecimento.

Palavras-chave: Antioxidantes. Radicais Livres. Ferro. Levedura. Sirtuínas.

3 Finalidade

Contribuição por meio de resultados para a comunidade acadêmica que pesquisa nas temáticas, envelhecimento humano, estresse oxidativo e sirtuínas, bem como a descoberta de ações terapêuticas modificadoras.

4 Problemática e questão de pesquisa

Na atualidade, um dos principais focos da pesquisa em envelhecimento humano tem sido direcionado para a compreensão dos mecanismos que fundamentam o prolongamento da vida e o desenvolvimento de terapias preventivas e inovadoras.

O processo de envelhecimento predispõe uma série de eventos fisiológicos, dentre eles, o estresse oxidativo que está relacionado com grande número de doenças neurodegenerativas, aterosclerose, câncer, doenças autoimunes e inflamatórias. O estresse oxidativo será induzido no modelo levedura através da utilização de uma solução com sulfato ferroso que causará estresse celular, porém sem ser tóxico para as células. O ferro é um micronutriente essencial à vida, pois está envolvido em processos bioquímicos fundamentais como transporte de oxigênio, metabolismo energético e síntese de DNA. Em excesso torna-se letal, associado com o desenvolvimento de patologias e envelhecimento precoce.

Recentes investigações científicas evidenciam a utilização das terapias restrição calórica e antioxidantes naturais. Estas terapias favorecem o equilíbrio homeostático na defesa e sobrevivência celular, em resposta aos eventos do envelhecimento. Os testes realizados em inúmeros modelos experimentais, tais como roedores, leveduras, moscas da fruta e nematoides, comprovam as investigações. Além disso, é sabido que as sirtuínas (proteínas deacetilases de histonas) podem desempenhar um papel crítico na mediação dos efeitos fisiológicos da restrição calórica. As sirtuínas conseguem, através da RC, regular a longevidade, aumentando os níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) disponível. Portanto, a superexpressão do gene SIR resultaria em prolongamento da vida, enquanto a supressão do mesmo gene poderia provocar efeito contrário, diminuindo o tempo de vida útil.

Todavia, esta questão ainda é foco dos estudos de muitos pesquisadores, visto que resultados anteriores indicam que o prolongamento da vida via restrição calórica não depende da presença do gene SIR. Essa dúvida poderá ser sanada em pesquisas com leveduras que possuem seu genoma completamente sequenciado e apresentam quatro sirtuínas.

Neste contexto, pergunta-se: a utilização do extrato de *Spirulina platensis* e a restrição calórica poderão aumentar a longevidade e inibir os danos oxidativo induzidos pelo estressor Fe²⁺ em células de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene SIR1?

5 Justificativa

A importância desta proposta de estudo deve-se a elucidação dos eventos biológicos característicos do processo de envelhecimento. Existem várias abordagens capazes de aumentar a longevidade celular, porém os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos ainda não foram estabelecidos.

Pesquisas destacam a existência de substâncias e comportamentos que podem ter efeitos benéficos sobre a longevidade. Os autores sugerem que os benefícios antienvhecimento ou relativos à proteção de doenças podem ser alcançados pela prática de exercício físico, restrição calórica e consumo de antioxidantes (REBELATTO et al., 2008; BISHOP; GRARENTE, 2007; LEVENSON; RICH, 2007; ROCKENFELLER; MADEO, 2010).

Uma área ativa de pesquisa é a influência da dieta na longevidade, neste campo, a RC, tem sido repetidamente demonstrada como um fator crucial para o aumento da expectativa de vida e a redução de doenças relacionadas com a idade (SMITH; NAGY; ALLISON, 2010). Muitos dos efeitos da restrição calórica parecem ser mediados pela regulação dos genes envolvidos no reparo celular, na resistência ao estresse e na proteção contra danos oxidativos, assim como genes responsáveis pela prevenção de algumas alterações da expressão gênica que ocorrem com a idade (GENARO; SARKINS; MARTINI, 2009).

Para Genaro, Sarkis e Martini (2009), o mecanismo biológico responsável pelo efeito da RC na longevidade carece de informações. Estudos com leveduras mostram que o efeito determinante da longevidade via restrição calórica poderia ser mediado pela indução de um gene chamado *Silent Information Regulator* (SIR) que codifica uma enzima, a histona desacetilase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) (ALMEIDA, 2007; FONTANA; PARTRIDGE; LONGO, 2010; EVANS et al., 2010).

Outra abordagem importante é a terapia com substâncias antioxidantes. Estudos evidenciam os efeitos terapêuticos da *Spirulina platensis*, que incluem sua utilização como um antioxidante natural, bem como na redução da hipercolesterolemia e prevenção de certos tipos de cânceres (HIRAHASHI et al., 2002; ESTRADA; BESCO; FRESNO, 2001; BERTOLIN et al., 2009). Desta cianobactéria, se extrai a ficobiliproteína ficocianina, que apresenta capacidade antioxidante, atuando no aumento da imunidade e induzindo a apoptose em células cancerígenas, como na leucemia (LU; YU, LI, 2011).

Como vem sendo reportado na literatura, evidências indicam que as espécies reativas de oxigênio geradas por metais pesados também podem ter um papel importante na etiologia de doenças. O ferro em excesso no organismo mostra-se prejudicial e vem sendo associado ao desenvolvimento de desordens neurodegenerativas (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006; BRAR et al., 2009). Os metais de transição como o ferro, podem doar ou aceitar elétrons durante as reações intracelulares, catalisando a formação de radicais livres (RL) como na reação de fenton: H_2O_2 (ROS) + $Fe^{2+} = Fe^{3+} OH$ (RL) + OH^- . Desta forma o ferro pode aumentar a produção de RL e levar à peroxidação lipídica, a danos no DNA e proteínas, bem como na eventual degeneração dos neurônios (D'OLIVEIRA; FRANK; SOARES, 2007; SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006; BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008).

É importante salientar que o ferro é essencial para o metabolismo neuronal normal, incluindo sua participação na geração de energia mitocondrial e mielinização. No entanto, os níveis excessivos é que podem levar ao estresse oxidativo e a neurodegeneração. Durante o processo de envelhecimento normal, várias regiões do cérebro tendem a acumular ferro. O aumento da deposição deste mineral tem sido observado em várias desordens neurológicas crônicas como na doença de Alzheimer e Parkinson (KHALIL; TEUNISSEN; LANGKAMMER, 2011).

Estratégias para controlar os danos causados pelo excesso de ferro podem advir da utilização de antioxidantes naturais, bem como, de ações preventivas que evitem à sobrecarga deste mineral no organismo, protegendo da oxidação as moléculas funcionais (proteínas, lipídios, ácidos nucleicos) que são afetadas neste processo (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008).

Os danos celulares provocados por espécies reativas de oxigênio ocorrem devido a um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, onde os primeiros são predominantes (VASCONCELOS et al., 2007). Estes danos têm sido associados ao desenvolvimento de patologias (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

O estudo do envelhecimento humano está em evidência, entretanto há uma grande dificuldade em procedê-lo, devido sua longa duração em estudos *in vivo* e por razões éticas. A fim de saber mais sobre a biologia do envelhecimento, é fundamental ter modelos adequados para desenvolver pesquisas (KAEBERLEIN, 2010). Neste contexto

a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada um dos modelos eucarióticos mais importantes para estudos do envelhecimento. Além disso, sob o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos mais utilizados em testes biológicos (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005; KAEBERLEIN, 2010, YUCEL; ULGEN, 2011).

Embora o grande interesse e as muitas iniciativas existentes cooperem na busca de terapias antienvhecimento, faz-se necessário ampliar as informações sobre o uso da restrição calórica e de substâncias funcionais com capacidade antioxidante, quando expostos a um estressor.

A intenção de realizar a presente proposta de trabalho se justifica visto os interesses da comunidade científica em esclarecer os mecanismos moleculares e bioquímicos do envelhecimento humano e, em levantar dados que comprovem a eficácia das terapias citadas acima para que no futuro possamos fazer uso em nosso benefício.

6 Objetivo da pesquisa

6.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da restrição calórica e do extrato de *Spirulina platensis* frente ao Fe^{2+} no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

6.2 Objetivos específicos

Verificar se o Fe^{2+} atua como estressor no modelo *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e deletada ao gene SIR1;

Avaliar a sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao Fe^{2+} nas cepas controle e deletada ao gene SIR1, antes e após o envelhecimento;

Verificar o efeito protetor da restrição calórica e do extrato de *Spirulina platensis* frente ao Fe^{2+} na lipoperoxidação de *Saccharomyces cerevisiae* nas cepas controle e deletada ao gene SIR1, antes e após o envelhecimento.

7 Fundamentação teórica/revisão da literatura

Os assuntos abordados na revisão da literatura contribuem para o entendimento da questão de pesquisa, são eles: envelhecimento humano, antioxidantes, *Spirulina platensis* e a ficocianina, radicais livres/estresse oxidativo, ferro (Fe^{2+}), restrição calórica, sirtuínas e *Saccharomyces cerevisiae*.

7.1 Envelhecimento humano

Com o relatado aumento da expectativa de vida nos últimos séculos, o processo de envelhecimento tem sido considerado um dos mais relevantes fenômenos epidemiológicos da história recente (BLAGOSKLONNY, 2010). Neste contexto, a longevidade passou a ser vista não só como um ganho para a sociedade, mas também como uma preocupação, devido ao aumento de patologias associadas ao avançar da idade, que interferem na qualidade de vida da população (ALMEIDA; MARCELINO; VIEIRA, 2012; NOALE et al., 2012).

O entendimento dos mecanismos pelos quais acontece o envelhecimento é ainda uma das grandes questões a serem resolvidas pela biologia moderna. A complexidade e a natureza multifatorial deste processo têm gerado uma vasta literatura e um grande número de teorias (LUKIW, 2007). De acordo com Kourtis e Tavernarakis (2011), o processo de envelhecimento humano é complexo e está ligado ao avanço da deterioração da função fisiológica e da homeostase do organismo.

As teorias biológicas do envelhecimento conseguem explicar algumas características do envelhecimento, no entanto os múltiplos mecanismos envolvidos no processo ainda não foram todos elucidados. O desenvolvimento de muitas teorias (moleculares, sistêmicas e evolutivas) mostra uma tendência competitiva entre os pesquisadores em relação às distintas hipóteses. O que chama atenção é a possibilidade de interação dessas teorias, que muitas vezes se complementam. A complexidade etiológica do fenômeno representa um desafio para a Ciência (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

7.2 Antioxidantes

No processo de envelhecimento acontecem modificações celulares que podem elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e são responsáveis por algumas

doenças relacionadas à idade. As ERO têm importante função biológica, uma vez que sinalizam distintos processos biológicos, como os processos de adaptação fisiológica instigados pelo exercício físico. A suplementação com agentes antioxidantes em indivíduos saudáveis pode inibir os processos de adaptação gerados pelas ERO. Já os organismos em desequilíbrio, ou seja, aqueles que apresentam estresse oxidativo podem tirar proveito da suplementação. Efeitos positivos podem derivar das ERO, por exemplo, quando no sistema imune os macrófagos usam o H_2O_2 para eliminar bactérias e outros micro-organismos indesejáveis. Os efeitos negativos também são sentidos, como a peroxidação lipídica que provoca modificações estruturais e funcionais na membrana das células, fato que prejudica o organismo e até mesmo pode causar a morte celular (SAMPAIO; MORAES, 2010).

A terapia antioxidante divide opiniões de cientistas e médicos. A maioria relaciona essa terapia com a administração de formulações à base de produtos com propriedades antioxidantes para tratar uma enfermidade específica. Portanto, se aceita que existe uma relação entre estresse oxidativo e o progresso ou etiologia de algumas doenças. Apesar disso, a terapia antioxidante é frequentemente reconhecida como secundária ou de menor importância na metodologia terapêutica. Os antioxidantes não são considerados medicamentos, pressupõe-se que são suplementos nutricionais ou produtos naturais para a saúde (SELLÉS, 2011).

Os antioxidantes são substâncias que em baixos níveis em relação a um substrato oxidável, retardam ou impossibilitam a sua oxidação. Segundo Galera (2011, p. 1248) esse processo pode ser realizado a partir de dois mecanismos: “(1) pela interrupção das reações em cadeia dos radicais livres por meio da doação de um íon de hidrogênio a outras substâncias, sem perder estabilidade; (2) pela reação direta com os radicais livres, transportando posteriormente o resíduo da reação”.

Há dois sistemas antioxidantes formados por micronutrientes e um sistema enzimático que agem conjuntamente para proteger as estruturas celulares dos danos. O sistema antioxidante não enzimático contém substâncias que atuam como cofatores, como, por exemplo, as vitaminas tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e retinol (vitamina A). Já o sistema enzimático é constituído por glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). A glutatona peroxidase reduz o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos, como os lipoperóxidos

provenientes da lipoperoxidação, impedindo a continuação desse processo danoso. A superóxido dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e dióxido e a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio em água e dióxido (GALERA, 2011).

O uso de terapias antioxidantes pode ser eficaz no retardamento do envelhecimento, seja reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou melhorando o sistema de defesa contra o estresse oxidativo. Apesar disso, não se sabe se é mais acertado dar substância antioxidante ou substâncias precursoras aos pacientes (GALERA, 2011).

Atualmente existem pouco mais de uma centena de produtos antioxidantes que foram testados e comprovadamente possuem atividade preventiva e reparadora de ERO. Há um grande número de formulações nomeadas antioxidantes, mas na verdade, a sua efetividade é duvidosa. Geralmente, essas formulações contêm extratos de produtos naturais que não foram testados suficientemente quanto ao seu potencial e aos possíveis efeitos tóxicos, agudos e crônicos (SELLÉS, 2011).

Diversos autores se dedicaram ao estudo do potencial antioxidante de plantas como a *Caryopteris odorata* (SHAHZADI et al., 2011); fungos como o *Pycnoporus sanguineus* (BORDERES et al., 2011); extrato de erva-mate (FERREIRA et al., 2011); produtos de uva não alcoólicos (MACHADO et al., 2011); polpas de frutas e compotas (BOF et al., 2012); arroz (WALTER; MARCHESAN, 2011); e algas marinhas (KELMAN et al., 2012).

7.3 *Spirulina platensis* e a ficocianina

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria, também chamada de microalga, que é encontrada nas águas alcalinas de lagos vulcânicos. É tradicionalmente consumida por populações africanas e mexicanas e em sua composição constam 62% de aminoácidos e uma extensa gama de pigmentos. É aceito que o extrato dessa microalga pode prevenir/inibir o câncer e por este motivo é comumente classificada como um alimento funcional (BHAT; MADYASTHA, 2000; ESTRADA; BESCÓS; VILLAR DEL FRESNO, 2001; BENEDETTI et al., 2004).

A indústria de alimentos tem interesse crescente pelos alimentos funcionais que são aqueles que possuem componentes bioquímicos ativos. Esses alimentos vêm

ganhando destaque nas seguintes temáticas: qualidade de vida, longevidade e saúde. Além disso, um dos aspectos para considerar um alimento como funcional é o seu potencial como antioxidante (GUARIENTI; BERTOLIN; COSTA, 2010).

Segundo Estrada e cols. (2001) e Santiago-Santos e cols. (2004), a ficocianina é uma importante ficobiliproteína, complexos pigmento-proteína que estão envolvidos na captação de luz para a microalga, presente na *Spirulina platensis* com propriedades terapêuticas, além de ser usada como corante natural. Dentre as propriedades terapêuticas destaca-se sua atividade antioxidante, devido sua capacidade de sequestrar radicais hidróxido e alcóxido. Vale ressaltar que a ficocianina possui 20 vezes mais atividade antioxidante que o ácido ascórbico.

A ficocianina é um antioxidante natural que pode prevenir ou diminuir a deterioração lipídica no processamento de pescado salgado. Os resultados desse estudo indicam a possibilidade de substituir o antioxidante sintético pelo natural (BERTOLIN et al., 2011).

Segundo achados de Guarienti, Bertolin e Costa (2010) o uso da *Spirulina platensis* em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com paraquat 10 e 15mM maximizou a sobrevivência celular em 15,3% e 40,8%, respectivamente. Houve atenuação do estresse oxidativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente ao estressor 1,1'- dimetil - 4,4'- bipyridílio (paraquat), pela *Spirulina*. Os resultados deste estudo corroboram com resultados já existentes na literatura sobre o potencial antioxidante da *Spirulina*.

As terapias restrição calórica e a ficocianina foram utilizadas em testes com ratos para quantificar o envelhecimento desses animais. Quando as terapias foram usadas de forma isolada, não comprometeram o ganho de peso e a eficiência alimentar e agiram atenuando o dano oxidativo. Já a ação sinérgica da restrição calórica e da ficocianina atuou como pró-oxidante (CENTENARO et al., 2010).

Em um estudo sobre a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* frente a *Spirulina platensis*, observou-se que a microalga promoveu um aumento da sobrevivência celular da levedura quando exposta aos estressores paracetamol, glutamato monossódico e paraquat de 21,2%, 22,9% e 34,9% respectivamente, demonstrando capacidade de atenuação do estresse oxidativo. Os autores do artigo afirmam que os resultados podem ser inferidos para o homem já que é um experimento *in vivo*, tornando a *Spirulina*

platensis uma opção de suplemento nutricional rico em antioxidantes (GUARIENTI et al., 2010).

Os estudos de Bermejo, Pinero e Villar (2008) e Estrada, Bésco e Villar del Fresno (2001) demonstram que a *Spirulina platensis* é um potente eliminador de radicais livres, tendo a capacidade de inibição da peroxidação lipídica microsomal. Deng e Chow (2010) também comprovam o efeito benéfico da *Spirulina* na prevenção de toxicidade induzida em órgãos de roedores como fígado, rins, cérebro através da diminuição da peroxidação lipídica.

A *Spirulina platensis* recebe interesse nas investigações científicas devido ao seu potencial nutritivo e capacidade antioxidante (WU et al., 2011). Além disso, ela tem sido testada em diferentes modelos experimentais, corroborando com resultados efetivos no tratamento de cânceres (HIRAHASHI et al., 2002) nas dislipidemias (BERTOLIN et al., 2009; DENG; CHOW, 2010) e diabetes (PARIKH; MANI; IYER, 2001), como anti-inflamatório (SHIH et al., 2009) como redutor de peso (PAIVA; ALFENAS; BRESSAN, 2007) e com função de neuroprotetor (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008).

7.4 Radicais livres/Estresse oxidativo

Os conhecimentos a respeito da ligação entre estresse oxidativo e longevidade, bem como sobre o impacto do envelhecimento na eficiência da resposta ao estresse provêm de estudos em organismos modelo, tais como, moscas, vermes, leveduras e ratos (KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011).

O estabelecimento do estado de estresse oxidativo se deve a um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros. Existem limites fisiológicos e requerentes de regulação que precisam ser mantidos e isso é feito pelo sistema de defesa antioxidante, que impede que os danos oxidativos se alastrem, acabando em danos sistêmicos impossíveis de reparar (BARBOSA et al., 2010).

De acordo com Galera (2011), os organismos aeróbicos necessitam de oxigênio para sobreviver, no entanto quando a concentração de oxigênio é superior àquela encontrada na natureza, podem ocorrer quadros de toxicidade. Os organismos aeróbicos utilizam o oxigênio molecular como aceptor de elétrons para transformar os alimentos ingeridos em energia para o organismo, esse processo é chamado de fosforilação oxidativa. Nesse processo, também são produzidas as espécies reativas de oxigênio

(ERO), que podem ser definidas como espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado no orbital mais externo.

As espécies reativas, também chamadas de radicais livres, são compostos químicos que tem instabilidade estrutural e isso faz com que busquem um elétron de outra substância para se estabilizar. A perda do elétron produz um novo radical livre que dá origem a uma reação em cadeia, causando lesões em várias estruturas celulares. A produção das ERO prevalece nas mitocôndrias onde ocorre o maior consumo de oxigênio celular. Essa organela serve ainda como uma cadeia de enzimas que executam reações de transferência de elétrons. Variadas espécies de ERO são produzidas no curso do metabolismo normal, sendo que elas podem provocar danos oxidativos que levam ao acréscimo do processo de peroxidação lipídica, à redução da fluidez da membrana e da quantidade de DNA celular, queda do número de mitocôndrias e modificação na atividade de suas enzimas (GALERA, 2011).

A peroxidação lipídica é um indicador de estresse oxidativo em células e tecidos e pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos. Os radicais livres atuam sobre os lipídios insaturados das membranas celulares acarretando a transformação de sua estrutura, a falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, em situação limite, a morte celular. A lipoperoxidação inicia-se com a perda de um elétron de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado e prossegue via espécies reativas, formando em princípio o hidroperóxido lipídico e depois o aldeído lipídico, ambos produtos estáveis (GALERA, 2011).

Os radicais livres são moléculas que possuem um elétron não pareado e altamente reativo, que tendem a se estabilizar e por isso tomam elétrons de outra molécula. A molécula doadora também precisa combinar-se com outras e, desse modo, ocorre uma reação em cadeia que pode provocar efeitos como danos em proteínas, membranas e ácido nucléicos, em particular o ácido desoxirribonucleico (DNA) (GUIMARÃES; CAMARGOS, 2011). Segundo esses autores, mais de 90% das espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas nas mitocôndrias, local onde ocorre a fosforilação oxidativa, ou seja, a produção de energia através do ciclo de Krebs.

O estresse oxidativo contribui para o envelhecimento das células por meio de diversos e complexos mecanismos celulares e moleculares. A produção de espécies reativas tende a aumentar com o envelhecer. No entanto, dietas menos calóricas, ricas em

antioxidantes e pobres em pró-oxidantes associadas a um estilo de vida saudável com controle do peso e prática regular de atividades físicas reduzem o estresse oxidativo, os radicais livres, melhoram a função mitocondrial, aumentam a longevidade e melhoram a saúde e a qualidade de vida dos idosos (SILVA; FERRARI, 2011).

De acordo com Galera (2011) o aumento do estresse oxidativo pode causar o aparecimento de muitas doenças neurodegenerativas, especialmente quando combinado com deficiências nutricionais. Com o envelhecimento ocorre um declínio na biodisponibilidade dos antioxidantes moleculares, pois há maior gasto para compensar o efeito deletério dos radicais livres. Além disso, a absorção dos nutrientes da dieta decai. Existem fatores que podem modular o estresse oxidativo e a dieta é um bom exemplo. A suplementação com vitaminas e minerais antioxidantes carece de mais testes em relação ao tempo e dose recomendadas. Mas alguns estudos já têm obtido resultados afirmativos sobre biomarcadores específicos, principalmente aqueles associados à oxidação de lipídios (malondialdeído e isoprostanos) de grande significância (BARBOSA et al., 2010). O exercício físico também atua no combate ao estresse oxidativo em pessoas idosas. No entanto, a intensidade do exercício físico é crucial, já que o exercício moderado é um potente agente antioxidante enquanto o exercício de alta intensidade pode causar um aumento exagerado de EROS, por meio da cadeia respiratória ou via processo inflamatório. Para fins de comprovação são necessários mais estudos a respeito da influência do exercício físico sobre os fatores que elevam o estresse oxidativo (SAMPAIO; MORAES, 2010).

Fatores exógenos também podem atuar na geração de radicais livres e nos sistemas de defesa antioxidante, são eles: xenobióticos, radiações ionizantes, metais pesados, tabagismo e ingestão de álcool. Todavia, ainda não foram estabelecidos os níveis de exposição necessários para causar danos em seres humanos (BARBOSA et al., 2010).

A formação de alguns radicais livres, como é o caso do radical hidroxila é, altamente dependente da ação de metais de transição que têm fraca ligação atômica e podem influenciar mudanças no estado de oxidação dos substratos. Vários metais de transição podem reagir diretamente com H_2O_2 para formar OH^+ (HALLIWEL, 2006). Além disso, os danos oxidativos da peroxidação lipídica vêm sendo descritos como uma das causas à toxicidade induzida pelo ferro. Segundo Durfinová e colaboradores (2012) o íon ferroso atua no aumento da formação de espécies reativas de oxigênio.

Embora se saiba que o envelhecer compromete os mecanismos de resposta ao estresse oxidativo, não está claro se esse comprometimento está associado à senilidade ou se é apenas um fator característico do avançar da idade. Pesquisas que manipulam geneticamente as vias de resposta ao estresse podem indicar um novo caminho para a ciência. Além disso, alvos potenciais para intervenção farmacêutica devem ser apontados pelas pesquisas a fim de que seja possível aumentar a resposta da célula ao estresse e os mecanismos de defesa durante o envelhecimento (KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011).

7.5 Ferro (Fe^{2+})

O ferro é essencial à vida devido a sua capacidade em transferir e receber elétrons, participando como catalisador das reações redox que ocorrem nas células. É um nutriente essencial para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência da maioria dos organismos (FERNANDEZ et al., 2007).

Os principais efeitos tóxicos do ferro envolvem interações com um grande número de processos celulares que podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio. Um aumento na formação de ERO induzida por ferro pode ocasionar alterações funcionais e danos às membranas celulares (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008). O ferro apresenta alta reatividade, uma vez que catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio por meio da transferência de um elétron para o oxigênio molecular (O_2), produzindo o superóxido (O_2^-) precursor do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 , por sua vez, reage com o Fe^{2+} gerando o potente radical hidroxil (OH), através da reação de Fenton (Equação 1). Tais espécies radicalares podem promover a oxidação de diversas moléculas e organelas gerando danos celulares (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006).

O íon Fe^{2+} está diretamente ligado à oxidação de biomoléculas. Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes à ocorrência das reações de oxidação são Cu^{1+} e Fe^{2+} . Nesse sistema, a importância do ferro é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade e, no organismo, na maior parte do tempo ele encontra-se complexado com proteínas de transporte (transferrina) e armazenamento (ferritina e hemosiderina) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Os metais de transição como ferro e cobre, podem doar ou aceitar elétrons livres durante reações intracelulares, catalisando a formação de radicais livres, como na reação de Fenton. Visto que a maior

parte do ferro intracelular está na forma férrica (Fe^{3+}) ele primeiro precisa ser reduzido para a forma ferrosa (Fe^{2+}) para participar da reação de Fenton (FERNANDEZ, et al., 2007).



No estado metabólico normal, o superóxido favorece a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} , no entanto, se a concentração intracelular de superóxido é elevada, a reação favorece a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} perpetuando a reação de Fenton e formando mais radicais hidroxila (CASTELLANI et al., 2007). Os níveis das espécies reativas de oxigênio são minimizados pela ligação dos íons a proteínas de armazenamento e de transporte (transferrina, ferritina, lactoferrina e ceruloplasmina) que agem como quelantes e diminuem a formação de hidróxido de oxigênio (OH) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2006).

O estresse oxidativo resultante dos níveis aumentados de ferro no organismo tem sido implicado na morte neuronal das doenças de Parkinson e Alzheimer, na esclerose lateral amiotrófica, na esclerose múltipla, na doença de Huntington e outras doenças neurodegenerativas (FIGUEREDO et al., 2011).

Segundo Hoogeraad (2011) a patogênese das doenças neurodegenerativas especialmente a doença de Alzheimer, podem estar relacionadas com o acúmulo de metais livres como cobre e ferro a nível cerebral. O cobre e o ferro livres podem estar envolvidos em catalisar a reação de Fenton, levando a geração de radicais livres como o peróxido de hidrogênio que danifica os neurônios.

7.6 Restrição calórica

A Restrição calórica (RC) caracteriza-se pela redução da ingestão de calorias de 20- 40% abaixo do *ad libitum*, sem desnutrição, sendo uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas para se estender o tempo de vida em uma variedade de espécies, inclusive mamíferos (SKINNER; LIN, 2010; COLMAN et al., 2009).

O primeiro estudo científico demonstrando os efeitos da restrição calórica na longevidade foi realizado em 1935 por McCay e colaboradores, utilizando ratos como

modelo experimental. Nesta pesquisa, foi observado que a RC quando aplicada após a puberdade, aumentou a expectativa de vida, além de prevenir ou atenuar a severidade de doenças crônicas em roedores (MCCAY; CROWEL; MAYNARD, 1935).

Estudos indicam que a restrição calórica é capaz de aumentar a longevidade em uma série de organismos modelos como moscas, fungos, nematoides, camundongos e macacos. Além de prolongar a expectativa de vida, a RC também se associa a redução de doenças relacionadas à idade, levando à sugestão de que ela poderia ser utilizada como terapia para aumentar a longevidade em seres humanos (SCHLEIT et al., 2011).

Alguns estudos relatam que a dieta com RC contribui com a longevidade em razão da menor geração de espécies reativas de oxigênio. Segundo esta hipótese, a RC promove uma mudança metabólica resultando em um transporte de elétrons mais eficiente na cadeia respiratória mitocondrial, podendo levar a uma redução da produção de radicais livres na mitocôndria, uma das maiores fontes de espécies reativas intracelulares (SHARMA; AGRAWAL; ROY, 2011; PALLAVI; GIORGIO; PELLICI, 2012).

Segundo Guarente e Picard (2005), em nível fisiológico os efeitos da restrição calórica são muito bem caracterizados, e se iniciam com uma fase aguda, período de imposição da dieta, seguida por um período adaptativo, alcançando um estado fisiológico alterado e estável. As principais alterações correspondem a diminuição da temperatura corporal, dos níveis sanguíneos de glicose e insulina, redução do peso e da gordura corporal.

A RC em humanos é ainda uma prática de conveniência duvidosa e difícil de ser mantida por um longo período de tempo, comumente as pesquisas são realizadas em modelos de laboratório (SMITH; NAGY; ALLISON, 2010). Desde então, muitos estudos surgiram mostrando que a RC retarda o envelhecimento em leveduras, moscas, peixes, ratos e macacos (HOLLOSZY; FONTANA, 2007). Em adição, trabalhos recentes têm sugerido uma sobreposição entre os determinantes genéticos da longevidade através de uma variedade de espécies eucarióticas (SMITH et al., 2007; KAEBERLEIN, 2010).

Colman e colaboradores (2009) em estudo realizado com macacos *Rhesus sp.* verificaram que os animais em restrição calórica tiveram um percentual de morte por causas relacionadas ao envelhecimento inferior quando comparados aos macacos do grupo controle. Além disso, verificou-se menor incidência de doenças cardiovasculares e câncer no grupo sobre RC.

Algumas hipóteses têm sido propostas, como a redução da gordura corporal e sinalização da insulina, onde a alteração fisiológica que ocorre durante o período de restrição calórica é iniciada com a redução da concentração de glicose, ocasionada pela baixa ingestão de energia proveniente da dieta. Este protocolo de restrição alimentar é, de forma geral, o mais utilizado em leveduras (GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009; KAEBERLEIN, 2010).

Na atualidade, a restrição calórica é evidenciada como a única intervenção não genética capaz de aumentar a longevidade em diferentes modelos experimentais desde leveduras até primatas (SCHIRMER et al., 2009). Segundo Sohal e Weindruch (1996), Mannarino e colaboradores (2008; 2010), os mecanismos moleculares pelos quais ocorre o retardo do envelhecimento vêm sendo associados com a ativação de uma família de enzimas denominada sirtuínas com atividade desacetilase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺).

A restrição calórica é capaz de modular mudanças biológicas relacionadas ao envelhecimento, como a síntese e degradação proteica, geração de ERO, peroxidação lipídica, funções mitocondriais e amenizar condições de lesões patológicas, como tumores e catarata (MANNARINO, 2009).

7.7 Sirtuínas

As sirtuínas são proteínas deacetilases de histonas, NAD-dependentes, que estão relacionadas com mecanismos de sobrevivência. Elas aumentam a estabilidade do genoma através de processos de reparação, silenciamento genético e manutenção dos telômeros e são ativadas quando ocorre a elevação nos níveis de estresse oxidativo, impedindo danos no genoma (ECHEVERRI-RUÍZ; MOCKUS-SIVICKAS, 2010).

Segundo Nakagawa e Guarente (2011), é de extrema importância descobrir o que acontece com a atividade das sirtuínas no decorrer do processo de envelhecimento. Existem evidências de que ocorre uma queda nas atividades dessas proteínas e, por isso, o interesse nas substâncias que possam servir como ativadores de sirtuínas para combater o envelhecimento. Em vista disso, a elucidação das funções das sete sirtuínas dos mamíferos em tecidos diferentes pode fornecer alvos para a intervenção terapêutica.

As pesquisas científicas vêm comprovando que as sirtuínas desempenham inúmeras funções biológicas. A SIRT1, por exemplo, está envolvida na regulação da

obesidade e associada com doenças metabólicas através da regulação das proteínas PGC-1a, UCP2 e LXR. Além disso, a superexpressão da SIRT1 pode aumentar o risco de câncer em mamíferos, por reduzir a atividade da p53 e inibir potencialmente outros genes tumorais supressores. Entretanto, o papel da SIRT1 no câncer ainda gera controvérsias, já que sua atuação pode suprimir ou promover tumores. Nos últimos 10 anos, os resultados de estudos têm desvendado o papel das sirtuínas em diferentes organismos modelo. No entanto, ainda há muitas questões a serem respondidas. A perspectiva futura é evidenciar se as sirtuínas podem ser alvo de novas terapias para atenuar as doenças associadas à idade, tais como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares e, com isso, estender o tempo de vida (RAHMAN; ISLAM, 2011).

A SIRT1 foi identificada e amplamente investigada, sendo expressa no cérebro, coração, fígado, pâncreas, músculo esquelético, baço e tecido adiposo. Em nível celular, a SIRT1 está presente no núcleo e no citoplasma, com expressão dominante no núcleo. Além disso, está presente nas células do sistema nervoso central. A SIRT1 tem um papel importante em vários processos biológicos que vão desde estresse oxidativo, proliferação e metabolismo celular e estabilidade genômica. Curiosamente, a SIRT1 demonstrou regular a proteção celular contra o estresse oxidativo, em muitos os estados de doença que envolvem a neurodegeneração, desordens metabólicas e cardiovasculares (CHONG et al., 2012).

As sirtuínas são produtos de genes específicos e a expressão destes genes, bem como a atividade dessas proteínas nos tecidos são fortemente afetadas por mudanças no ambiente, na dieta e estilo de vida. Alguns fatores referidos por influenciarem na expressão das sirtuínas, são: restrição calórica, exercício físico, álcool, fumo, exposição ao frio, estresse oxidativo e administração de compostos como resveratrol, quercetina e melatonina (KELLY, 2010).

Em pesquisa desenvolvida com o objetivo de caracterizar o papel neuroprotetor do resveratrol no estresse oxidativo e na agregação de proteínas, bem como para descobrir se a proteção seria dependente da SIRT1. Como esperado, o grupo submetido ao estresse oxidativo, mas anteriormente incubado com resveratrol foi protegido de danos celulares. Em contraste, quando as células foram silenciadas para SIRT1 e, em seguida, expostas a H₂O₂ na presença de resveratrol, não houve diferença para o grupo exposto a H₂O₂ sozinho (ALBANI et al., 2009).

As sirtuínas tem a capacidade de bloquear vários processos que podem contribuir para a lesão neuronal, incluindo a agregação e acumulação de proteínas, o envolvimento com as vias de morte celular e a disfunção mitocondrial. Uma tendência das pesquisas atuais é descobrir ativadores de sirtuínas que são de grande interesse para a ciência por atuarem na proteção dos neurônios e reprimirem respostas inflamatórias patogênicas das células gliais, via ativação ou inibição das sirtuínas. Por isso, acredita-se que as sirtuínas podem fornecer novas terapias para prevenir ou retardar o envelhecimento e as doenças neurodegenerativas (GAN, 2010).

Segundo Imai (2009), na última década se tem obtido progresso no entendimento dos mecanismos moleculares antienvhecimento da restrição calórica em mamíferos. Além disso, a SIRT1 e, possivelmente, as outras sirtuínas desempenham um papel crítico na mediação destes efeitos fisiológicos da restrição calórica.

Embora a restrição calórica tenha sido caracterizada como uma estratégia eficaz no tratamento das doenças do envelhecimento é muito difícil aderir a este regime, devido à fome e ao prazer relacionado à ingestão dos alimentos. Uma boa alternativa é o uso de compostos ativadores de SIRT1 que podem mimetizar os efeitos da restrição calórica (SMITH et al., 2009).

7.8 *Saccharomyces cerevisiae*

Por definição leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem principalmente por brotamento, como é o caso da *Sacharomyces cerevisiae*. O brotamento é uma forma de reprodução assexuada onde ocorre a formação de pequenas protuberâncias, chamadas brotos, a partir da célula mãe. No geral, os fungos podem exibir dois tipos de crescimento, unicelular ou filamentosos, que são alternados em consequência de específicas condições ambientais. A levedura *S. cerevisiae* sempre permanece na forma unicelular, a não ser em condições de baixo nível de nitrogênio disponível. Essa condição do meio faz com que a levedura inicie a fase filamentosos para procurar alimento. Por este motivo, a *S. cerevisiae* é cultivada em laboratório em meios que contém todos os nutrientes necessários para que ela continue a existir como levedura (GRANDI, 2001).

Saccharomyces cerevisiae tem capacidade de detectar e responder adequadamente à ameaça constante de estresse oxidativo, usando diversas estratégias mostradas na **Figura 1**. É imprescindível ressaltar que estas vias defensivas são largamente

conservadas em mamíferos. Por este motivo, a levedura é considerada um modelo de pesquisa poderoso, cuja utilização pode elucidar muitos aspectos de importantes patologias humanas que são mais difíceis de estudar usando outros organismos modelo eucariotos mais complexos (FARRUGIA; BALZAN, 2012).

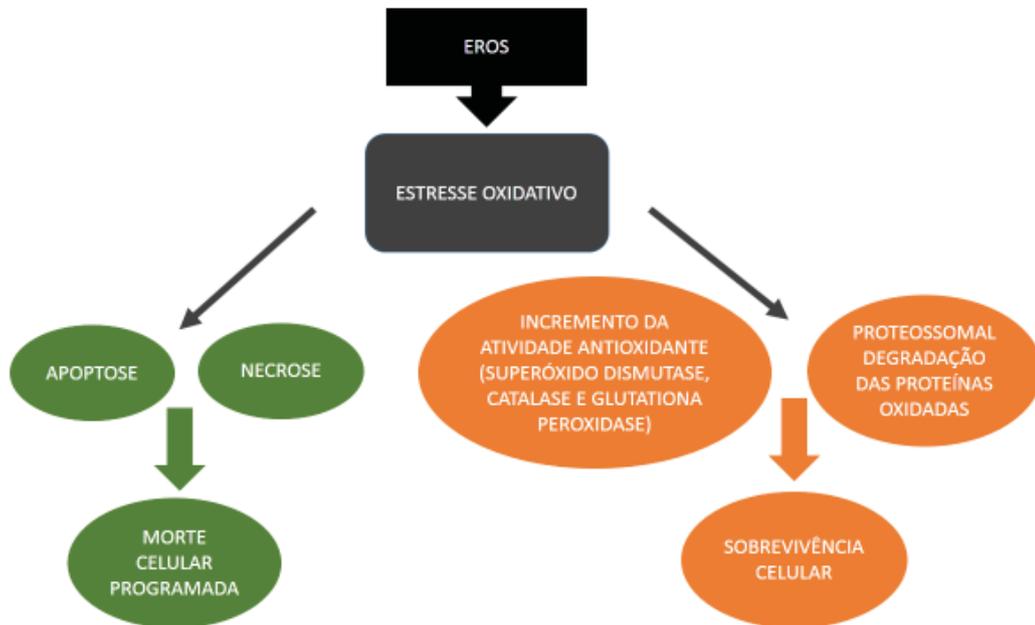


Figura 1 - Respostas celulares ao estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae*, por meio de mecanismos de sobrevivência celular ou morte celular programada. Adaptado de (FARRUGIA; BALZAN, 2012).

A *S. cerevisiae* tem sido utilizada em estudos de metabolismo, genética molecular e de desenvolvimento de eucariontes e dos cromossomos. A propósito, foi o primeiro organismo eucarionte a ter seu genoma sequenciado e caracteriza-se por ser de fácil manipulação genética e por crescer em meios de cultura definidos (GRANDI, 2001).

8 Hipótese

A utilização das terapias, restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis*, favorecem a sobrevivência celular e reduzem os danos oxidativos no organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* em todos os tratamentos. Ao contrário, a deleção do gene SIR 1 provoca o aumento da peroxidação lipídica e a consequente diminuição da sobrevivência celular.

9 Metodologia

9.1 Delineamento geral do estudo

Estudo quantitativo experimental que será realizado no Laboratório de Fermentações da Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo.

9.2 Substância antioxidante

A microalga *Spirulina platensis*, proveniente do Laboratório de Engenharia Bioquímica do curso de Engenharia de Alimentos da FURG-RS, será utilizada nos experimentos. O potencial antioxidante da referida microalga já foi testado e comprovado pelo grupo de pesquisa liderado pelos pesquisadores Jorge Alberto Vieira Costa e Telma Elita Bertolin.

9.2.1 Extrato aquoso de *Spirulina platensis*

O extrato de *Spirulina platensis* será obtido por meio de um processo de congelamento e descongelamento. Para isso, utilizar-se-á 1 g da microalga e 30 mL de água destilada e estéril, que serão misturadas e acondicionadas em embalagem plástica com tampa. Essas embalagens serão congeladas a 0 °C durante 3 horas e descongeladas a 4 °C durante o mesmo tempo. Este processo será repetido por três vezes. Em seguida as amostras serão submetidas à centrifugação 6000 rpm por 15 min e então o sobrenadante será extraído, sendo este o extrato de *Spirulina platensis* (COSTA et al., 2005).

A concentração do extrato de *Spirulina platensis* será determinada através da Equação 1, conforme Benett e Bogorad (1973):

$$CE = \frac{Abs_{620} - 0,474(Abs_{652})}{5,34} \quad (1)$$

Onde:

CE = concentração do extrato (mg/mL)

Abs 620 = absorvância em 620 nm

Abs 652 = absorvância em 652 nm

9.3 Modelo experimental

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que serão utilizadas nesse estudo são provenientes da Euroscarf, Frankfurt/Germany. O **Quadro 1** apresenta as cepas da levedura e seus respectivos genótipos.

Quadro 2: Cepas e genótipos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Cepas	Genótipos
*BY4741	MAT A; his 3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0
SIR 1	Isogênica a BY4741 exceto o gene <i>sir1::kMX4</i>

*Cepa Controle (C).

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* serão mantidas em tubos de ensaio com meio de cultivo Yeast Peptone Dextrose (YPD) sólido e inclinado e sob refrigeração de 4 °C. A manutenção destas leveduras será realizada por meio de repiques periódicos, aproximadamente, a cada três meses. Apenas o meio de cultivo da cepa mutante SIR 1, será acrescido de 0,02 % de geneticina a fim de garantir a estabilidade da linhagem, já que esse antibiótico inibe a síntese proteica em células eucariontes (MUNÓZ, 2007).

9.4 Meio de cultivo

O **Quadro 2** apresenta os componentes do meio de cultivo padrão YPD. É importante ressaltar que a composição de glicose é menor quando a levedura é submetida à condição de restrição calórica (0,5 %).

Quadro 2: Meio YPD de manutenção da levedura

Componentes	Composição (%)
Glicose	2 (P)* e 0,5 (RC)*
Peptona	2
Extrato de levedura	1
Ágar	2

*(P) padrão; (RC) restrição calórica.

9.5 Condições de cultivo

As leveduras serão retiradas de um repique fresco em meio sólido e cultivadas em erlenmeyers, contendo 100 mL de meio de cultivo líquido YPD 2 % ou YPD 0,5 %. Após a realização do inóculo, as culturas serão incubadas em temperatura de 28 °C no agitador orbital ajustado para 160 rpm. Após um período de aproximadamente 24 horas, alíquotas de 10 mL serão retiradas do inóculo e acrescentadas a outros erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultivo autoclavado. Então, os erlenmeyers voltarão para o agitador orbital. No dia seguinte, realizar-se-ão as leituras de absorvância a um comprimento de onda (γ) de 570 nm e será calculado o volume de meio de cultivo necessário para a obtenção de 50 mg de células, conforme **Figura 2**.

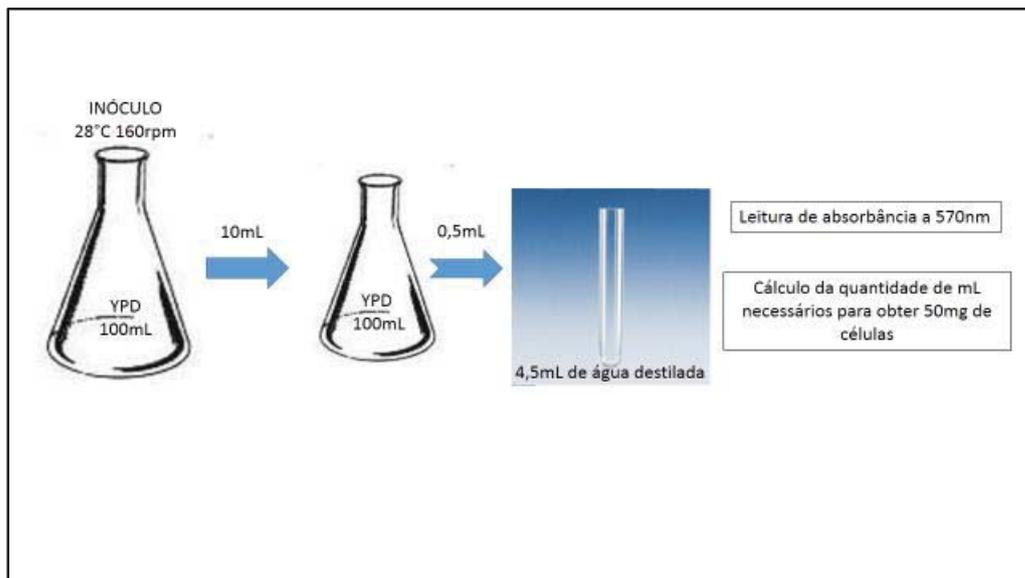


Figura 2 - Desenho esquemático do cultivo de células de levedura em meio YPD.

9.6 Crescimento celular

O crescimento celular será avaliado através da medida de absorvância de uma suspensão de células convertida em concentração de células (mg/mL). O fator de conversão será calculado a partir da filtração de um volume adequado da suspensão de células em filtro Millipore (0,45 μm), posteriormente colocado para secar em estufa a 60 °C até atingir o peso constante (construção de uma curva de peso seco).

9.7 Curvas de peso seco

Inicialmente deve-se crescer a levedura em meio de cultivo YPD líquido até Abs. aproximadamente 1, medida em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 570 nm. Após, deve-se proceder o preparo das soluções que serão filtradas. O **quadro 3** apresenta o volume de solução padrão (meio de cultivo YPD com a levedura crescida) e meio de cultivo (YPD puro) para cada amostra, preparada em balão volumétrico.

Quadro 3: Procedimento experimental para a realização das curvas de peso seco das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Balão volumétrico 50 mL	Solução padrão (mL)	Meio de cultivo YPD (mL)
1	0	50
2	2,5	47,5
3	5	45
4	7,5	42,5
5	10	40
6	15	35
7	20	30
8	25	25
9	40	10
10	50	0

Previamente os papéis filtro deverão ser acondicionados em placas de Petri com numeração e secados em estufa a 60 °C durante 1 hora, com a placa destampada. Após

serão pesados em balança analítica e colocados em dessecador, retirando o vácuo. É necessário montar o sistema para filtração contendo dois kitassatos, filtro, bomba à vácuo, pegador e bureta (25 mL). O papel filtro será colocado no filtro milipore e preso com o pegador. A bureta deverá ser preenchida até a marca de 25 mL, cuidando para não ficarem bolhas de ar na válvula de abrir/fechar. O sistema montado será colocado abaixo da bureta, a bomba será ligada e a válvula da bureta aberta para que o líquido pingue no centro do papel filtro. Serão filtrados 25 mL de solução. Após a bomba será desligada, a prensa retirada com cuidado e o filtro milipore depositado na placa de Petri. Deve-se lavar o filtro do sistema com água destilada e secar. A bureta deverá ser lavada com a solução seguinte, sempre lembrando que se começa com a solução menos concentrada para a mais concentrada. Na sequência, realizar-se-ão as leituras de absorbância (570 nm) em triplicata, com o restante de solução dos balões volumétricos.

Após a filtração, os papeis filtro serão colocados em estufa à 60 °C e pesados de hora em hora em balança analítica, até que atinjam o peso constante. Os valores obtidos na pesagem e por espectrofotometria deverão ser anotados para o cálculo posterior. Em tabela do excel, será calculada a média das absorbâncias e a diferença entre o peso do papel filtro tarado e após atingir o peso constante. Então, deverá ser elaborado um gráfico contendo a absorbância no eixo “y” e concentração da levedura no eixo “x”. Por fim, será necessário inserir a equação da reta para visualizar o resultado.

9.8 Tratamentos

Os tratamentos com extrato de *Spirulina platensis* e sulfato ferroso, já foram utilizados em um trabalho anterior do grupo de pesquisa liderado pela Dra. Telma Elita Bertolin. Estes tratamentos foram testados na levedura *S. cerevisiae* e ficou comprovado, por meio de testes citotóxicos, as concentrações que são toleráveis pela levedura. Desta forma, pouparemos esforços, avançando nas análises.

9.8.1 Tratamento com extrato aquoso de *Spirulina platensis*

De acordo com Benetti (2013), a concentração 0,8 mg/mL de extrato de *Spirulina platensis* não é tóxica e pode ser usada nas células da levedura.

9.8.2 Tratamento com sulfato ferroso

Segundo resultados do trabalho de Benetti (2013), as células da levedura apresentam tolerância em concentração 100 mM de sulfato ferroso. Já uma concentração superior correspondente a 400 mM, seria letal para as células. No entanto, a autora testou ainda uma concentração intermediária, igual a 200 mM e a levedura tolerou também essa concentração. Dessa forma, e de acordo com sugestões da banca do referido trabalho de conclusão, será utilizada a concentração de 200 mM nos testes com *S. cerevisiae*.

9.9 Delineamento experimental

O delineamento experimental será realizado conforme apresentado no **Quadro 4**.

Quadro 4: Delineamento experimental para verificação do efeito da restrição calórica e da *Spirulina platensis* no cultivo da *Saccharomyces cerevisiae*.

Tratamentos	Cultivos
01	Padrão (P)
02	Padrão acrescido de extrato de <i>Spirulina platensis</i> (PSp)
03	Padrão + Íon Fe ²⁺ (PFe ²⁺)
04	Padrão acrescido de extrato de <i>Spirulina platensis</i> + Íon Fe ²⁺ (PSPFe ²⁺)
05	Restrição calórica (RC)
06	Restrição calórica acrescida de extrato de <i>Spirulina platensis</i> (RCSp)
07	Restrição calórica + Íon Fe ²⁺ (RCFe ²⁺)
08	Restrição calórica acrescida de extrato de <i>Spirulina platensis</i> + Íon Fe ²⁺ (RCSPFe ²⁺)

As condições experimentais prevista no **Quadro 3** serão aplicadas na as cepas da levedura apresentadas no **Quadro 1**.

9.10 Simulação do envelhecimento cronológico

Após a realização dos tratamentos com sulfato ferroso e extrato de *Spirulina platensis*, as células serão expostas ao processo de envelhecimento cronológico. Este consiste na ressuspensão de 50 mg de células em 10 mL de água estéril, transferido para

erlenmeyer de 50mL e incubado a 37 °C/160 rpm durante 24 horas (ELEUTHERIO et al., 1995).

9.11 Viabilidade celular

A viabilidade celular será analisada via plaqueamento, em triplicata e em meio sólido YPD 2 %, antes e após o envelhecimento (ELEUTHERIO et al., 1995). As placas serão incubadas a 28 °C por 72 horas e o número de colônias será contado. O percentual de sobrevivência determinar-se-á através da **Equação 2**, de acordo com Eleutherio e seus colaboradores (1995):

$$\text{Sobrevivência} = \frac{\text{Contagem 2}}{\text{Contagem 1}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

Contagem 1= Número de colônias antes do envelhecimento

Contagem 2 = Número de colônias após o envelhecimento

9.12 Oxidação de lipídios pelo método de TBARS

Inicialmente deve-se recolher por centrifugação cerca de 50 mg de células antes e após 1 hora e 24 horas de exposição ao extrato de *Spirulina platensis*, bem como, ao estressor Fe²⁺. As células serão lavadas duas vezes com água destilada gelada, ressuspensas em 500 µL de TCA 10 % (ácido tricloroacético) e transferidas para tubos de parede grossa. Serão adicionadas 1,5 g de pérolas de vidro para que ocorra o rompimento celular sob agitação vigorosa com 6 ciclos de 20 segundos no agitador de tubos e 20 segundos no gelo.

O extrato será recolhido em microtubo e as pérolas de vidro lavadas com 500 µL de TCA 10 %, sendo recolhidos no mesmo eppendorf. Após a lise os extratos serão centrifugados a 4000 rpm, sendo o sobrenadante coletado e utilizado para as análises de peroxidação lipídica através do método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O ensaio foi será realizado conforme a **Quadro 5**.

Quadro 5: Composição das soluções para utilização na metodologia TBARS

	Branco	Amostra 1 (mL)	Amostra 2 (mL)
Água destilada	0,3	0,15	-
EDTA 0,1 M	0,1	0,1	0,1
Extrato	-	0,15	0,15
tiobarbitúrico 1 % em NaOH 0,05 M	0,6	0,6	0,6
Volume total	1	1	1

A mistura reacional será incubada a 100°C por 15 minutos. Os tubos serão resfriados e a absorbância medida a 532nm.

A dosagem será determinada através da **Equação 3**, de acordo com Steels, Learmonth e Watson (1994). Sendo fator para obtenção da concentração de malonaldeído determinado a partir de uma curva analítica com padrão TMP (1,1-3,3-tetrametoxipropano).

$$MDA = \frac{(Abs\ 532 \times f') \times 1000}{(Abs\ 570 \times f \times 100) \times 4,9 \times 0,30} \quad (3)$$

Onde:

MDA = concentração de malonaldeído (pmolesMDA/mg de células peso seco);

Abs 532 = absorbância medida no comprimento de onda de 532 nm;

Abs 570 = absorbância medida no comprimento de onda de 570 nm;

f' = fator obtido a partir da curva analítica com o padrão TMP;

f = fator obtido a partir da curva de peso seco da levedura;

100 = diluição realizada para medir a absorbância;

4,9 = volume (mL) após leitura de absorbância;

0,30 = quantidade de amostra utilizada no teste.

9.13 Curva padrão do TMP (1,1,3,3 tetrametoxipropano)

A curva padrão de TMP (1,1,3,3 tetrametoxipropano) será obtida utilizando 11 alíquotas (0,25 mL, 0,50 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 2,5 mL, 3,0 mL, 3,5 mL, 4,0 mL,

4,5mL e 5,0 mL) de tetrametoxipropano (TMP) em concentração de 0,2 mM, que serão colocadas em balões volumétricos de 50 mL cada e seu volume completado com ácido tricloroacético a 10 % (**Quadro 6**). Destas soluções serão retiradas alíquotas de 5 mL, posteriormente transferidas para tubos de ensaio e adicionado a eles 5 mL de ácido 2-tiobarbitúrico a 0,02 M. Os tubos serão fechados com algodão, levados a banho-maria fervente por 15 minutos e resfriados imediatamente em banho de gelo por 5 min. Após o resfriamento será realizada a leitura em espectrofotômetro a 532 nm.

Quadro 6: Procedimento experimental para a confecção da curva com padrão
TMP (1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano)

Balão	TMP 0,2 mM (mL)	TCA 10 % (mL)	TBA 0,02 M (mL)
Branco	0	50	5
1	0,25	49,75	5
2	0,50	49,5	5
3	1,0	49	5
4	1,5	48,5	5
5	2,0	48	5
6	2,5	47,5	5
7	3,0	47	5
8	3,5	46,5	5
9	4,0	46	5
10	4,5	45,5	5
11	5	45	5

* TMP = tetrametoxipropano; TCA = ácido tricloroacético; TBA = ácido tiobarbitúrico.

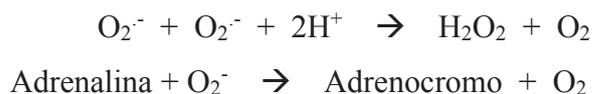
9.14 Atividade da superóxido dismutase pelo sistema de detecção adrenalina-citocromo

Dentre as defesas enzimáticas responsáveis pela proteção dos sistemas biológicos, encontram-se a superóxido dismutase (SOD). A atividade desta enzima foi descrita pela primeira vez por McCord e Fridovich (1969). Atualmente, sabe-se que existem três tipos de superóxido dismutase (SOD):

- a) a que contém cobre e zinco em seu sítio de ativação e que é encontrada no citosol;
- b) a que contém manganês, apresenta na matriz mitocondrial;

c) a que contém ferro, que é encontrada em bactérias e plantas.

Este grupo de enzimas catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathiona peroxidase. A velocidade da reação catalisada pela SOD é 10^4 vezes maior que a velocidade de dismutação espontânea em pH fisiológico (SOUTHORN; POWIS, 1988; CHANGE; SIES; BOVERIS, 1979).



Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de formação do Adrenocromo.

Esta técnica para a determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50 % a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM, pH 10) e adrenalina (1 mM) (BOVERIS et al., 1983).

Para realização dos ensaios serão coletadas 50 mg de células que serão tratadas, lavadas duas vezes com tampão fosfato e submetidas à lise celular com esferas de vidro e 500 μL tampão fosfato pH 7,0. Os extratos celulares serão obtidos por três ciclos de forte agitação em vórtex por 1 min, intercalados com 1 min no gelo. As células serão centrifugadas a 1500 rpm por 3 min e recolhido o sobrenadante para as análises de atividade enzimática.

Preparo dos reagentes:

a) Bitartarato de adrenalina 60 mM – solução em água miliQ pH 2,0 ajustado com HCl
Reagente fotossensível \rightarrow deve ficar protegido da luz.

PM: 333,3

Dissolver em solução já ajustada (H₂O miliQ/HCl pH 2,0)

1000 mM ----- 333,3 g ----- 1000 mL

60 mM ----- 19,998 g ----- 1000 mL

0,2 g em 10 mL

ou Dissolver em solução H₂O/HCl pH 2,0

0,1g em 5mL

b) Glicina 50 mM pH 10,62

PM: 75,07

pH ajustado com NaOH 10 M após a solubilização do pó

1000 mM ----- 75,07 ----- 1000 mL

50 mM ----- 3,75 ----- 1000 mL

3,75 g em 1000 mL de água

0,375 g em 100 mL de água

c) NaOH 10M

PM: 40

1 M ----- 40 g ----- 1000 mL

10 M ----- 400 g ----- 1000 mL

10 M ----- 40 g ----- 100 mL

10 M ----- 4 g ----- 10 mL

Diluir 4 g de NaOH em 10 mL de água destilada.

d) Tampão fosfato de sódio pH 7,0

Fosfato de sódio monobásico (X)

PM: 27,6

Fosfato de sódio dibásico (Y)

PM: 53,65

Misturar 39 mL de X com 61 mL de Y e acrescentar 100 mL de água destilada, num total de 200 mL de solução tampão.

Com os reagentes prontos, o próximo passo será adicionar 1 mL de tampão glicina e zerar o espectrofotômetro. Em seguida, colocar 17 µL de adrenalina (concentração final na cubeta 1 mM) e iniciar a leitura a 480 nm. Esta leitura corresponde ao basal. Na sequência, para cada amostra, devem-se repetir os seguintes passos:

1º) Adicionar 1 mL de tampão + 20 µL de amostra, zerar o espectro. Colocar 17 µL de adrenalina e iniciar a leitura.

2º) Adicionar 1 mL de tampão + 40 µL amostra, zerar o espectro. Colocar 17 µL de adrenalina e iniciar a leitura.

3º) Adicionar 1 mL tampão + 60 µL amostra e zerar o espectro. Colocar 17 µL de adrenalina e iniciar a leitura.

Deve-se tomar nota das inclinações das retas obtidas para calcular em planilha de Excel através das medidas das absorbâncias. Os resultados serão expressos em unidades de SOD.

9.15 Análise dos dados

Os resultados serão tratados estatisticamente por meio do desvio padrão, análise de variância ANOVA e teste t de Student. Este último denotará homogeneidade entre os grupos experimentais a 5 % de significância ($p \leq 0,05$).

10 Cronograma

O desenvolvimento do trabalho experimental ocorrerá entre os meses de março a novembro de 2013. No **Quadro 7** estão descritas as atividades, bem como o período em que serão executadas.

Quadro 7: Cronograma de atividades previstas para o projeto

Ações e atividades	Período em bimestres			
Atualização da literatura	X	X	X	X
Testes preliminares, preparação dos meios de cultivo e crescimento da levedura nas diferentes condições de cultivo	X			
Curvas de peso seco da levedura SIR 1 e Controle	X			
Viabilidade celular		X	X	
TBARS, SOD		X	X	X
Análise dos resultados e tratamento estatístico		X	X	X
Elaboração de artigos para publicação em periódicos da área			X	X

11 Orçamento

O **Quadro 8** apresenta o cronograma financeiro para a realização do presente projeto.

Quadro 8: Cronograma financeiro do presente projeto

Material de expediente	R\$ 500,00
Meio de cultivo	R\$ 4.000,00
Passagens	R\$ 500,00
Índrarias (placas de Petri, tubos de ensaio e erlenmeyers)	R\$1.100,00
Total	R\$ 6.100,00

Referências

ALBANI, D. et al. The Sirt1 activator resveratrol protects SK- N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by α -synuclein or amyloid- β (1-42) peptide. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, p. 1445–1456, 2009.

ALMEIDA, H. O metabolismo nos caminhos do Envelhecimento. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 2, p. 39-46, 2007.

ALMEIDA, A. S.; MARCELINO, P. C.; VIEIRA, P. S. Empoderamento no processo de envelhecimento humano: algumas reflexões e contribuições sobre saúde e qualidade de vida. **EFDeportes.com - Revista Digital**, Buenos Aires, v. 17, n. 167, 2012.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENEDETTI, S. et al. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Life Sciences**, v. 75, p. 2353-2362, 2004.

BENNETT, A. BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58 n. 2, p. 419-435, aug. 1973.

BENETTI, F. **Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2***. 2013. 232f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

BERMEJO, P. B.; PINERO, E. P.; VILLAR, A. M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p.1496–1502, 2008.

BERTOLIN, T. E. et al. Efeito antioxidante da ficocianina em pescado salgado-seco. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 4, p. 751-757, jul./ago. 2011.

BERTOLIN, T. E. et al. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1253-1259, 2009.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 20-25, 2000.

BISHOP, N. A.; GUARENTE, L. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 835-844, 2007.

BLAGOSKLONNY, M. V. Calorie restriction decelerating mTOR-driven aging from cells to organisms (including humans). **Cell Cycle**, v. 9, n. 4, p. 683-688, 2010.

BOF, C. M. J. et al. Effect of Freezing and Processing Technologies on the Antioxidant Capacity of Fruit Pulp and Jelly. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, n. 1, p. 107-114, jan./feb. 2012.

BORDERES, J. et al. Antioxidant Activity of the Extracts from *Pycnoporus sanguineus* Mycelium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 6, p. 1167-1174, nov./dec. 2011.

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated-rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 227, p. 534-541, 1983.

BRAR, S. et al. Iron Accumulation in the Substantia Nigra of Patients With Alzheimer Disease and Parkinsonism. **Archives of Neurology**, v. 66, n. 3, p. 371-374, 2009.

CASTELLANI, R. et al. Iron: the redoxactive center of oxidative stress in Alzheimer disease. **Neurochemical Research**, n. 32, p.1640-1645, 2007.

CENTENARO, A. et al. Restrição calórica e ficocianina no processo do envelhecimento de ratos. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, Passo Fundo, v. 7, p. 80-89, 2010. supl. 1.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, p. 2007.

CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHONG, Z. Z. et al. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 16, n. 2, p. 167–178, feb. 2012.

COLMAN, R. J. et al. Calorie Restriction Delays Disease Onset and Mortality in rhesus Monkeys. **Science**, v. 325, p. 201-204, jul. 2009.

COSTA, J. A. V. et al. Purification of *Spirulina platensis* Phycocyanin. **Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard**, v. 14, p. 63-64, 2005.

D'OLIVEIRA, F. A.; FRANK, A. A.; SOARES, E. A. A Influência dos minerais na doença de Parkinson. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 77-88, abr. 2007.

DENG, R.; CHOW, T. J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, p. 33-45, 2010.

ĎURFISOVÁ, M. et al. Influence of Some Mineral Ions on Lipid Peroxidation in Vitro. **Prague Medical Report**, v. 113, n. 3, p. 181-188, 2012.

ECHEVERRI-RUIZ, N. P.; MOCKUS-SIVICKAS, I. Mecanismos celulares en respuesta al estrés: sirtuinas. **Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia**, v. 58, n. 3, p. 221-232, 2010.

ELEUTHERIO, E. C. A. et al. Effect of trehalose during stress conditions in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 36, p. 1217-1223, 1995.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

EVANS, C. et al. NAD⁺ metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity. **Chemical Biology**, v. 10, n. 2, 2010.

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. 64, p. 1-21, jun. 2012.

FERNANDEZ, L. L. et al. Ferro e neurodegeneração. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 218-224, out./dez., 2007.

FERREIRA, E. L. et al. Natural Antioxidant from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Prevents Hamburger Peroxidation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 803-809, jul./aug. 2011.

FIGUEREDO, Y. N. et al., A strong protective action of guttiferone-A, a naturally occurring prenylated benzophenone, against iron-induced neuronal cell damage. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 36-46, apr. 2011.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. D. Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans. **Science**, v. 328, n. 5976, p. 321-326, apr. 2010.

GALERA, S. C. Estresse oxidativo, antioxidantes e envelhecimento. In: FREITAS, E. V. de et al. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

GAN, L. Therapeutic potential and challenges of targeting sirtuins in neurodegenerative diseases. **Frontiers Biology**, v. 5, n. 4, p. 324–330, 2010.

GENARO, P. S.; SARKIS, K. S.; MARTINI, L. A. O efeito da restrição calórica na longevidade. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 667-672, 2009.

GRANDI, R. A. P. (Trad.). Fungos. In: RAVEN, P. H; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 297-335.

GUARENTE, L.; PICARD, F. Calorie restriction the SIR2 connection. **Cell**, v.120, n.4, p. 473-482, 2005.

GUARIENTI, C. et al. Viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* tratada com *Spirulina platensis*. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, Passo Fundo, v. 7, p. 144-150, 2010. Supl. 1.

GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor Paraquat. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.1, p. 106-111, 2010.

GUIMARÃES, R. M.; CAMARGOS, E. F. de. In: FREITAS, E. V. de et al. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, 2006.

HIRAHASHI, T. et al. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 423-434, 2002.

HOLLOSZY, J. O.; FONTANA, L. Caloric restriction in humans. **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 8, p. 709-712, 2007.

HOOGERAAD, T. U. Paradigm shift in treatment of Alzheimer disease: zinc therapy now a conscientious for individual patients. **International Journal of Alzheimer Disease**, p. 1-6, 2011.

IMAI, S-I. SIRT1 and Caloric Restriction: An Insight Into Possible Trade- Offs Between Robustness and Frailty. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 12, n. 4, p. 350-356, jul. 2009.

KAEBERLEIN, M. Lessons on longevity from budding yeast. **Nature**, v. 464, 2010.

KELLY, G. S. A Review of the Sirtuin System, its Clinical Implications, and the Potential Role of Dietary Activators like Resveratrol: Part 1. **Alternative Medicine Review**, v. 15, n. 4, p. 313-328, 2010.

KELMAN, D. et al. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 10, p. 403-416, 2012.

KHALIL, M.; TEUNISSEN, C.; LANGKAMMER, C. Iron and neurodegeneration in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis International**, p. 1-6, 2011.

KOURTIS, N.; TAVERNARAKIS, N. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 13, p. 2520–2531, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Robbins e Contran: patologia bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1592 p.

LEVENSON, C. W.; RICH, N. J. Eat less, live longer? New insights into the role of caloric restriction in the brain. **Nutrition Reviews**, v. 64, p. 412-415, 2007.

LU, W; YU, P.; LI, J. Induction of apoptosis in human colon carcinoma COLO 205 cells by the recombinant a subunit of C-phycoyanin. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 637-44, 2011.

LUKIW, W. J. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. **Neuroreport**, v. 18, p. 297-300, 2007.

MACHADO, M. M. et al. Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 798-803, 2011.

MANNARINO, S. C. et al. Glutathione is necessary to ensure benefits of caloric restriction during ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mechanisms of ageing and development**, v. 129, p. 700-705, 2008.

MANNARINO, S. C. et al. Requirement of glutathione for Sod I activation during lifesoan extension. **Yeast**, v. 28, p. 9 – 25, 2010.

MANNARINO, S. C. **O envolvimento da glutathione em abordagens que levam a um aumento de longevidade em *Saccharomyces cerevisiae***. 2009. 117f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

MCCAY, C. M.; CROWEL, M. P.; MAYNARD, L. A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the Ultimate body size. **The Journal of Nutrition**, v. 10, n. 1, 1935.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MUNÓZ, E. G. **Papel de las caveolas/caveolina -1 em la fisiología del adipocito**. Tesis doctoral. 2007. 90f. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 2007.

NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 6, p. 833-838, 2011.

NOALE, M. et al. Longevity and health expectancy in an ageing society: implications for public health in Italy. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 48, n. 3, p. 292-299, 2012.

PAIVA, A. C.; ALFENAS, R. C. G.; BRESSAN, J. Efeitos da alta ingestão diária de proteínas no metabolismo. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Porto Alegre, v. 22, n. 1, p. 83-88, 2007.

PALLAVI, R.; GIORGIO, M.; PELICCI, P. G. Insights into the beneficial effect of caloric/ dietary restriction for a healthy and prolonged life. **Frontiers in Physiology**, v. 23, n. 3, p.318-321, 2012.

PARIKH, P.; MANI, U.; IYER, U. Role of *Spirulina* in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus. **The Journal of Medical Food**, v. 4, n. 4, p. 193-9, 2001.

RAHMAN, S.; ISLAM, R. Mammalian Sirt1: insights on its biological Functions. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 11, p. 1-8, 2011.

REBELATTO, J. R. et al. Antioxidantes, atividade física e estresse oxidativo em mulheres idosas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 8-11, 2008.

ROCKENFELLER, P.; MADEO, F. Ageing and eating. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, p. 499–506, 2010.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. de. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Motriz**, Rio Claro, v. 16 n. 2, p. 506-515, abr./jun. 2010.

SANTIAGO-SANTOS, M. et al. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix sp.* **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047-2052, 2004.

SCHIRMER, H. et al. **Regulação da expressão de SIRT1, PGC-1 e PPAR influenciado por trans-resveratrol no fígado de Zebrafish.** In: IV MOSTRA DE PESQUISA DA PÓS-GRADUAÇÃO – PUCRS, 2009, Porto Alegre, 2009, p. 92-92.

SCHLEIT, J. et al. The MDT-15 Subunit of Mediator Interacts with Dietary Restriction to Modulate Longevity and Fluoranthene Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Plos One**, v. 6, n. 11, p. 1-7, 2011.

SELLÉS, A. J. N. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. **Revista Cubana de Salud Pública**, v. 37, p. 644-660, 2011. Supl.

SHAHZADI, T. et al. Caryopteris odorata: a rich source of antioxidants for protection against chronic diseases and food products. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 56, n. 1, p. 678-681, 2011.

SHARMA, P. K.; AGRAWAL, V.; ROY, N. Mitochondria-mediated hormetic response in life span extension of calorie-restricted *Saccharomyces cerevisiae*. **Age (Dordr.)**, v. 33, n. 2, p. 143-154, 2011.

SHIH, C. M. et al. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycoyanin. **Anesthesia & Analgesia**, v. 108, p. 1303-1310, 2009.

SILVA, W. J. M. da; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SIQUEIRA, E. M. A.; ALMEIDA, S. G.; ARRUDA, S. Papel adverso do ferro no organismo/ The adverse role of iron in the organismo. **Comunicação Ciência e Saúde**, Rio de Janeiro, v. 17. n. 3, p.229-236, 2006.

SKINNER, C.; LIN, S. J. Effects of calorie restriction on life span of microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 817-28, 2010.

SMITH, D. L. et al. Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins. **Aging Cell**, v. 6, p. 649-662, 2007.

SMITH, D. L. JR.; NAGY, T. R.; ALLISON, D. B. Calorie Restriction: What Recent Results Suggest for the Future of Aging Research. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 40, n. 5, p. 440–450, 2010.

SMITH, J. J. et al. Small molecule activators of SIRT1 replicate signaling pathways triggered by calorie restriction *in vivo*. **BMC Systems Biology**, v. 3, n. 31, p. 1-14, 2009.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M., Avaliação de compostos antioxidantes em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n.1, 2005.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, p. 59-63, 1996.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, n. 4, p. 381-389, 1988.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology**, v. 140, p. 569-576, 1994.

TEIXEIRA, I. N. D. O.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845-2857, 2010.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WALTER, M.; MARCHESAN, E. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 371-377, mar./apr. 2011.

WU, L. C. et al. Antimelanogenic effect of c-phycoyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. **Journal of Biomedical Science**, v.18, n.1, p. 557-559, oct. 2011.

YUCEL, E. B.; ULGEN, K. O. A network-based approach on elucidating the multi-faceted nature of chronological aging in *S. cerevisiae*. **Chronological Aging Network of Yeast**, v. 6, p. 3-17, dez. 2011.

