

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 *sir2***

Fábia Benetti

Passo Fundo

2013

Fábia Benetti

Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2*

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.

Orientador:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Telma Elita Bertolin

Coorientador:

Prof. PhD. Tiago Fleming Outeiro

Passo Fundo

2013

CIP – Catalogação na Publicação

---

- B465r Benetti, Fábيا
- Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2* / Fábيا Benetti. – 2013.  
[128] f. : il. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, 2013.  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Telma Elita Bertolin.  
Coorientador: Prof. PhD. Tiago Fleming Outeiro.
1. Radicais livres (Química) - Efeito fisiológico. 2. Spirulina. 3. Agentes antioxidantes. 4. Envelhecimento. 5. Ferro - Metabolismo. I. Bertolin, Telma Elita, orientador. II. Outeiro, Tiago Fleming, coorientador. III. Título.

CDU: 613.98

# ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA ALUNA

**FÁBIA BENETTI**

Aos vinte e dois dias do mês de março do ano dois mil e treze às nove horas, realizou-se, na Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, a sessão pública de defesa da Dissertação: **"Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir 2*"**, apresentada pela mestranda Fábيا Benetti, que concluiu os créditos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Envelhecimento Humano. Segundo os encaminhamentos do Conselho de Pós-Graduação (CPG) do Mestrado em Envelhecimento Humano e dos registros existentes nos arquivos da Secretaria do Programa, a aluna preencheu todos os requisitos necessários para a defesa. A banca foi composta pelos professores doutores Telma Elita Bertolin - orientadora e presidente da banca examinadora (UPF), Tiago Fleming Outeiro, Camila Pereira Leguisamo, Vanessa Corralo Borges, Adriano Pasqualotti e Diego Bonatto. Após a apresentação e a arguição da dissertação, a banca examinadora considerou a candidata **APROVADA**, em conformidade com o disposto na Resolução Consun Nº 07/2010.

A banca recomenda a consideração dos pareceres, a realização dos ajustes sugeridos e a divulgação do trabalho em eventos científicos e em publicações.

Encerrados os trabalhos de defesa e proclamados os resultados, eu, Profª. Drª. Telma Elita Bertolin, presidente, dou por encerrada a sessão pela banca.

Passo Fundo, 22 de março de 2013.

Profª. Drª. Telma Elita Bertolin  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Prof. PhD. Tiago Outeiro Fleming  
Universidade de Lisboa - UL

Profª. Drª. Camila Pereira Leguisamo  
Universidade de Passo Fundo - UPF

Prof. Dr. Adriano Pasqualotti  
Universidade de Passo Fundo - UPF

Profª. Drª. Vanessa Corralo Borges  
UNOCHAPECÓ

Prof. Dr. Diego Bonatto  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Leonildo e Zelmira, que sempre me incentivaram a trilhar pelos caminhos da vida com humildade, dignidade, respeito, ética e muito amor.*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus por ter me dado saúde, por me oportunizar tudo que tive na minha vida até o presente momento e por ter me colocado em uma família fantástica. Obrigada Senhor por me amparar nos momentos incertos, me dar força e coragem para superar as dificuldades, mostrando-me os caminhos nas horas mais difíceis.*

*À minha família (Zelmira, Leonildo, Quéli, Flávia, Leandro e Natália) que compartilharam meus ideais e os alimentaram, me incentivando a prosseguir a jornada, fossem quais fossem os obstáculos. Agradeço á vocês que mesmo distantes, se mantiveram sempre ao meu lado, saibam que tenho por todos, há mais profunda, admiração e respeito.*

*À minha orientadora, professora Telma Elita Bertolin, pela oportunidade concedida e pela confiança depositada, pelos ensinamentos e amizade ao longo destes dois anos de convívio.*

*Ao meu coorientador, professor Tiago Fleming Outeiro, pelas contribuições ao trabalho, pelo exemplo de competência e amor pela ciência.*

*Ao professor Adriano Pasqualotti, pela ajuda, amizade e paciência. Você que me recebeu em sua casa tantas vezes, deixando seus afazeres para me ajudar, muito obrigada.*

*À Camila e Bruna, meu grupo de pesquisa do laboratório! Agradeço a vocês que sempre estiveram ao meu lado, nestes anos, vivenciando momentos de amizade, cansaço, desespero, medos e alegrias! A vocês que foram imprescindíveis para a construção deste trabalho, o meu muito obrigado.*

*Aos amigos do laboratório Marta, Marina, Noany, Luana, Neto e Gisele agradeço pelo constante incentivo, amizade e companheirismo durante estes anos de convívio.*

*À Universidade de Passo Fundo especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano pelas oportunidades e auxílio financeiro.*

*À todos os professores do PPGEH que me ofereceram a oportunidade de estudar o envelhecimento e por semearem reflexões importantes para a minha formação como Mestre.*

*Aos colegas do PPGEH, Alessandra, Graciela, Neuza, Taise e Diego, agradeço pela amizade e carinho. Foi muito bom ter conhecido vocês, e poder conviver com pessoas tão especiais, saibam que estarão para sempre no meu coração!*

*À Rita, secretária do PPGEH, pela amizade, pelas conversas, risadas e pela alta qualidade dos serviços prestados, estando sempre pronta a ajudar no que fosse necessário.*

*Aos funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UPF pelo constante auxílio, sendo que nunca mediram esforços para ajudar-me.*

*À Faculdade de Engenharia de Alimentos, que foi a minha casa durante estes dois anos, foram dias, noites, madrugadas, finais de semana, em que estive lá. Agradeço por terem cedido o laboratório e toda a estrutura física para a realização deste estudo.*

*Quero expressar minha gratidão e apreço a todos que de alguma forma participaram, torceram, acreditaram e incentivaram para que eu pudesse alcançar mais este objetivo. Meus sinceros agradecimentos.*

## **EPIGRAFE**

*"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis à ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade é o que devem tender os programas e os métodos de ensino."*

*(Rui Barbosa)*

## RESUMO

BENETTI, Fábila. Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2*. 2013. [128] f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

O processo de envelhecimento é acompanhado por mudanças na atividade de células, tecidos e órgãos. O acúmulo progressivo destas alterações tem sido associado ao desequilíbrio na homeostase do organismo em relação a determinados metais, com ênfase ao íon ferroso, configurado na evolução de patologias neurodegenerativas. O uso de terapias antioxidantes pode interferir neste processo, reduzindo o estresse oxidativo e os danos causados pelo acúmulo do íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). A cianobactéria *Spirulina platensis* destaca-se por apresentar propriedades funcionais, como antioxidante natural, verificada em modelos in vivo e in vitro. A restrição calórica (RC) tem sido identificada com potencial em reduzir ou retardar patologias associadas ao envelhecimento, bem como, estender o tempo de vida em diversos modelos experimentais. Seus benefícios podem estar relacionados com a ativação da indução do gene Silent Information Regulator 2 (SIR2). Neste contexto, buscamos avaliar o potencial do extrato de *Spirulina platensis* e da RC, em células de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ao íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Cepas de *S. cerevisiae*, controle (WT) e deletadas ao gene *sir2* (*sir2Δ*) foram cultivadas em meio padrão (YPD 2 % glicose) e sobre restrição calórica (YPD 0,5 % glicose). Estas cepas foram na sequência expostas ou não a 1mM de  $\text{Fe}^{2+}$  e a 0,8 mg/mL de extrato de *Spirulina platensis* durante 1h e após foram submetidas a um meio não proliferante (água destilada estéril, temperatura de 37° C por 24 h), situação esta, que caracterizou o envelhecimento celular. As células foram coletadas para as análises de sobrevivência celular por plaqueamento e peroxidação lipídica pelo método TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), antes do envelhecimento (tempo 1 h) e após envelhecimento (tempo 24 h). Os resultados mostram que a sobrevivência celular foi reduzida nas cepas deletadas ao gene *sir2Δ*. Este efeito foi significativamente evidenciado ( $p < 0,05$ ) antes do envelhecimento para os tratamentos Padrão, RC e RC +  $\text{Fe}^{2+}$  e após o envelhecimento, este mesmo efeito foi observado para os tratamentos Padrão, Extrato de *Spirulina platensis*, RC, Extrato de *Spirulina platensis* +  $\text{Fe}^{2+}$ , RC +  $\text{Fe}^{2+}$ . Os resultados para peroxidação lipídica demonstram que a deleção de *sir2Δ* aumentou os níveis de malonaldeído (MDA). Este efeito foi significativo ( $p < 0,05$ ) antes e após o envelhecimento para os diferentes tratamentos, com exceção do tratamento Padrão no tempo de 1 hora. Neste contexto, concluímos que a deleção do gene *sir2Δ* diminui a sobrevivência celular e aumenta a peroxidação lipídica, para todos os tratamentos. Ainda podemos concluir, que as terapias antioxidantes (RC e extrato de *Spirulina platensis*) mostraram efeito protetor relativo à toxicidade induzida pelo íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nas cepas estudadas aumentando a sobrevivência celular e diminuindo a peroxidação lipídica para todos os tratamentos.

Palavras-chave: 1. Envelhecimento. 2. Antioxidantes. 3. Radicais Livres. 4. Ferro. 5. Levedura.

## ABSTRACT

BENETTI, Fábila. Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2*. 2013. [128] f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

The aging process is accompanied by changes in the activity of cells, tissues and organs. The progressive accumulation of these changes has been associated with an imbalance in the homeostasis of the organism in relation to certain metals, with emphasis on ferrous ion, configured in the evolution of neurodegenerative diseases. The use of antioxidant therapies may interfere with this process, reducing oxidative stress and damage caused by the accumulation of ferrous ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ). The cyanobacterium *Spirulina platensis* stands out for having functional properties as natural antioxidant, found in models in vivo and in vitro. The caloric restriction (CR) has been identified with potential to reduce or retard diseases associated with aging, as well as extending the life span in different experimental models. Its benefits can be related to the activation of gene induction Silent Information Regulator 2 (SIR2). We seek to evaluate the potential of the extract of *Spirulina platensis* and RC in *Saccharomyces cerevisiae* cells, subjected to  $\text{Fe}^{2+}$ . Strains of *S. cerevisiae*, control (WT) and deleted the SIR2 gene (*sir2Δ*) were cultured in standard medium (YPD 2% glucose) and on caloric restriction (YPD 0.5% glucose). These strains were further exposed or not exposed to 1mM  $\text{Fe}^{2+}$  and 0.8 mg / ml of extract from *Spirulina platensis* during and after 1h underwent a non proliferating (sterile distilled water, temperature of 37 ° C for 24 h), this situation, which characterized the cellular aging. Cells were collected for analysis of cell survival by plating and lipid peroxidation by the method TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) before aging time (1 h) and after aging (time 24 h). The results show that cell survival was reduced in the absence of *sir2Δ*. This effect was demonstrated significantly ( $p < 0.05$ ) before aging for treatments pattern, RC and RC +  $\text{Fe}^{2+}$  and after aging, this same effect was observed for treatments pattern Extract *Spirulina platensis*, RC, Extrac *Spirulina platensis* +  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  + RC. The results for lipid peroxidation demonstrate that deletion of *sir2Δ* increased levels of malonaldehyde (MDA). This effect was significant ( $p < 0.05$ ) before and after aging for all treatments, except for the standard treatment time of 1 hour. In this context, we conclude that the gene deletion *sir2Δ* decreases cell survival and increased lipid peroxidation for all treatments. Although we conclude that antioxidant therapies (RC and extract of *Spirulina platensis*) showed a protective effect on the toxicity induced by ferrous ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) for both WT cells, as for *sir2Δ*, with significant results ( $p < 0.05$ ) increase in cell survival and reduction in lipid peroxidation.

Key words: 1. Aging. 2. Antioxidants. 3. Free Radicals. 4. Iron. 5. Yeast.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra – acético
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe <sup>2+</sup>	Íon ferroso
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malonaldeído
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNDS	Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher
RC	Restrição calórica
RL	Radicais Livres
Sir 2	Silent Information Regulator 2
<i>sir2Δ</i>	Cepa deletada ao gene Silent Information Regulator 2
SNC	Sistema nervoso central
Tg	Tempo de geração celular
WT	Cepa controle (wild type)
YPD	Meio de cultivo contendo glicose, extrato de levedura e peptona

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA I</b>	<b>24</b>
	<b>RESTRIÇÃO CALÓRICA E EXTRATO DE <i>Spirulina platensis</i> FRENTE AO ÍON FERROSO (Fe<sup>2+</sup>) NO ENVELHECIMENTO DE CÉLULAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DELETADA AO GENE <i>sir2Δ</i></b>	<b>24</b>
2.1	<i>Introdução</i>	26
2.2	<i>Metodologia</i>	29
2.3	<i>Resultados</i>	32
2.4	<i>Discussão</i>	38
2.5	<i>Conclusões</i>	44
2.6	<i>Referências</i>	44
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>54</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>65</b>
	<i>Anexo A. Comprovante de submissão</i>	66
	<b>APÊNDICES</b>	<b>68</b>
	<i>Apêndice A. Curvas de Crescimento</i>	69
	<i>Apêndice B. Projeto de pesquisa</i>	74

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida nos últimos séculos, o processo de envelhecimento tem sido considerado um dos mais relevantes fenômenos epidemiológicos da história recente (VAULPEL, 2010; BLAGOSKLONNY, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2025 existirão dois bilhões de pessoas com mais de 60 anos, sendo que os idosos com 80 anos ou mais, constituem o grupo etário em maior crescimento (OMS, 2005).

O Brasil, antes referido como um país de jovens, também vem fazendo sua transição demográfica e passa por um rápido processo de envelhecimento populacional. Prevê-se que em 2020, haverá 1,2 bilhões de idosos no mundo, 34 milhões de brasileiros estarão acima de 60 anos, fato que colocará o país na sexta posição entre as nações mais envelhecidas do mundo (OMS, 2005; FILIPPSEN et al., 2008).

Com o aumento da expectativa de vida, a longevidade passou a ser vista não só como um ganho para a sociedade, mas também como uma preocupação, devido ao aumento de patologias, disfunções psicológicas e funcionais causadas pelo estilo de vida das pessoas, o que pode causar uma diminuição 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. Com destaque para as teorias “estocásticas”, baseadas no acúmulo aleatório de moléculas com alterações estruturais e/ou funcionais (LUKIW, 2007; FERREIRA; RODRIGUES; PAIVA, 2008).

---

Dentre as teorias estocásticas, a teoria dos radicais livres (RL) proposta por Denham Harman em 1956, estabelece que o envelhecimento advenha de efeitos deletérios às organelas celulares, causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) (AFANAS'EV, 2010). Sendo que o acúmulo de lesões moleculares provocadas por estas espécies, nos componentes celulares ao longo da vida, podem conduzir à perda de funcionalidade e ao desenvolvimento de doenças (RATTAN, 2006; GEMS; PARTRIDGE, 2013).

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. A condição de ímpar pode originar-se pela perda ou ganho de um único elétron (CAVALCANTE; BRUIN, 2009; POLJSAK et al., 2011). Uma vez formados estes buscam se estabilizar, cedendo ou doando um elétron às espécies químicas vizinhas. Desta forma, origina-se uma reação em cadeia que termina por alterar a conformação, a estrutura e função dos componentes celulares (SILVA; FERRARI, 2011). Um desequilíbrio entre a taxa de geração e a capacidade de remoção dos radicais livres, resulta em estresse oxidativo, que pode ser causa direta de uma patologia ou estar associado a uma forma de perpetuar o dano oxidativo contra células e tecidos causado por outro processo patológico (SULTANA; PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2012).

Os metais de transição como o ferro e o cobre, podem doar ou aceitar elétrons durante reações intracelulares, catalisando a formação de RL (FERNANDEZ et al., 2007). O ferro em sua forma ferrosa é quimicamente uma fonte irrefutável de estresse oxidativo, pois ele é capaz de formar RL via reação de Fenton (HALLIWEL et al., 1992), caracterizada pela degradação do  $H_2O_2$  por íons de ferro bivalentes gerando radical hidroxil, conforme ilustrado na reação:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-}$  (GILCA et al., 2007; BATISTA- NASCIMENTO et al., 2012).

O ferro é um dos micronutrientes mais estudados e melhor descritos na literatura. Pois, trata-se de um mineral essencial requerido para a manutenção estrutural e

---

funcional de várias moléculas, assim como para a sobrevivência, crescimento e proliferação celular (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006). O ferro é um elemento envolvido em várias funções metabólicas dos seres vivos, sua escassez é incompatível com a vida, e responsável por doenças como a anemia ferropriva (BATISTA; SOUZA; BRRESANI, 2008), entretanto, o excesso desse íon também é prejudicial, encontrando-se relacionado com a fisiopatogênese de várias doenças (FERNANDEZ et al., 2007; SHEFTEL; MASON; PONKA, 2012).

A deficiência de ferro compromete o desenvolvimento cognitivo, aumenta a morbimortalidade materna e infantil, reduz a capacidade de trabalho e a resistência imunológica (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006). Considerada a carência nutricional de maior magnitude no mundo, a anemia ferropriva, doença causada pela escassez extrema de ferro, atinge aproximadamente 30% da população mundial (VIEIRA; FERREIRA, 2010; AZEREDO et al., 2011). No Brasil dados da Pesquisa Nacional de Demografia Saúde da Criança e da Mulher (PNDS) realizada em 2008 indicam prevalência de anemia por deficiência de ferro na população de 20,9% para crianças e 29,4% em mulheres (BRASIL, 2008).

Devido a este fato, o Ministério da Saúde, implementou um programa nacional de combate a anemia ferropriva, tendo como uma de suas medidas, a fortificação das farinhas de milho e trigo com ferro e ácido fólico, comercializadas em todo território nacional por meio da Resolução da Anvisa RDC nº 344 de 15 de dezembro de 2002 (BRASIL, 2002).

Se por um lado, o olhar da ciência encontrou-se voltado há décadas para a deficiência de ferro e os problemas advindos desta condição, estudos da atualidade, trazem uma nova perspectiva com relação à ingestão e ao papel do ferro no organismo, afirmando que apesar de o mesmo ser um elemento essencial, torna-se deletério em quantidades excessivas, causando toxicidade, estando associado ao desenvolvimento de patologias relacionadas ao envelhecimento, com destaque às doenças

---

neurodegenerativas (NUNÉZ et al., 2012; ROSAS et al., 2012; SCHRÖDER; FIGUEIREDO; LIMA, 2012; SRIPETCHWANDEE et al., 2013).

O íon ferro é um elemento altamente reativo, com capacidade para ocupar múltiplos estados de oxidação, estando estes subjacentes tanto a sua utilidade como um cofator, quanto ao seu potencial para toxicidade pela formação de radicais livres que danificam membranas celulares e degradam o DNA (GLICKSTEIN et al., 2006; FERNADNEZ et al., 2007; BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008; NÚNEZ et al., 2012).

Considerando o potencial oxidante do ferro e o aumento da expectativa de vida do brasileiro, acredita-se que haja risco dessa fortificação indiscriminada aumentar a prevalência de doenças crônico-degenerativas em indivíduos com status nutricional adequado de ferro. Pesquisa realizada em 2008, não identificou estoques elevados de ferro na população brasileira, mas sugeriu que com o passar do tempo o excesso desse metal possa ocorrer (MENDES et al., 2009).

A homeostase do ferro é resultante de uma regulação estreitamente coordenada por diferentes proteínas envolvidas na sua captação, estoque e transporte intracelular. E como não existe um mecanismo ativo de excreção de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), este é facilmente acumulado em condições de excesso (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006).

O íon ferroso pode ser acumulado no organismo por fatores hereditários, por transfusões sanguíneas repetidas (KOHGO et al., 2010), e através da dieta (FLEMING et al., 2002). A ingestão excessiva de ferro através de fontes alimentares pode se dar pelo consumo demasiado de carnes em geral, principalmente carne vermelha e vitamina C (FLEMING et al., 2002; JIANG et al., 2004). Outro fator de acúmulo do metal que vem sendo evidenciado na literatura é o consumo indiscriminado de suplementos e alimentos fortificados contendo altas quantidades de ferro (FLEMING et al., 2002).

---

Em investigações recentes, o ferro tem sido descrito como um elemento importante na patogênese dos mecanismos de neurodegeneração (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008; NÚÑEZ et al., 2012; AKATAR et al., 2012). Segundo Nunez et al. (2012), as concentrações de ferro cerebral não são estáticas, elas aumentam com a idade, e em diferentes concentrações conforme a região do sistema nervoso central (SNC), provocando desordens neurodegenerativas.

Na doença de Alzheimer (DA), as alterações na homeostase do ferro foram evidenciadas através do aumento dos níveis séricos de uma proteína que se liga ao ferro, denominada p97. O acúmulo de ferro está relacionado com o aparecimento das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares, típicos dessa enfermidade. Níveis anormais de ferro afetam o córtex e o hipocampo do cérebro em pacientes com diagnóstico indicativo de DA. Além disso, nas áreas do encéfalo mais vulneráveis à neurodegeneração, o ferro, tem a capacidade de se acumular em grandes quantidades, não sendo acompanhado por mecanismos eficientes de homeostase deste mineral (ZATTA et al., 2009; BATTISTA-NASCIMENTO, 2012).

Acredita-se que o acúmulo de ferro nos neurônios provoque a peroxidação lipídica das membranas dessas células, tornando-as mais susceptíveis a toxinas, que causam disfunção celular (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006). A análise *post mortem* do cérebro de indivíduos com DA revelou ativação de dois indicadores enzimáticos de estresse oxidativo celular: heme oxigenase-1 ( $\text{OH}^{-1}$ ) e NADPH-oxidase (JAMOVA; VALKO, 2011). Em relação a modelos animais, Schroder e colaboradores (2011) verificaram em ratos adultos que receberam doses excessivas de  $\text{Fe}^{+2}$  por 10-12 dias, déficits de memória espacial, emocional e de reconhecimento, comprovando um efeito danoso tardio do ferro em comportamentos aprendidos.

Já na doença de Parkinson (DP) a neuromelanina da substância negra armazena grande quantidade de ferro, que pode migrar progressivamente para o citosol durante a patogênese da DP, aumentando a quantidade de RL e fazendo com que os neurônios

---

dopaminérgicos nigrais sejam peculiarmente suscetíveis ao estresse oxidativo. Evidências histológicas demonstram que os neurônios mais pigmentados são os primeiros a degenerarem na DP. Qualquer evento que concorra para aumentar o potencial oxidativo desses neurônios poderia constituir o motivo inicial desencadeante da cascata de degradação oxidativa. Além de contribuir para o estresse oxidativo, o ferro induz a agregação de  $\alpha$ -sinucleína, contribuindo para a formação de corpos de Lewy, sendo esta, característica principal da DP (OSHIRO; MORIOKA; KIKUCHI, 2011; BATISTA-NASCIMENTO et al., 2012).

Além da relação existente entre as doenças neurodegenerativas e o excesso de ferro, a associação do metal com outras patologias também vindo sendo relatada. Estudos evidenciam o envolvimento do íon ferroso com patologias como: a obesidade central (GILLUM, 2001), hipertensão (PIPERNO; TROMBINI; GELOSA, 2002) diabetes (JIANG; MANSON; MEIGS, 2004), doenças cardiovasculares e dislipidemias (LI et al., 2008; OLIVEIRA, 2007), doenças neurodegenerativas (NÚÑEZ et al., 2012), destacando a doença de Parkinson (YOUUDIM; BEM-SHACHAR; RIEDERER, 2009), Alzheimer (ALTAMURA; MUCKENTHALER, 2009) e Huntington (LEAL; CATARINO; PIMENTA, 2012; ROSAS et al., 2012).

Segundo estudos de Akatar et al.(2012) o ferro encontra-se associado a inúmeros processos patológicos devido a facilidade com que este íon é reversivelmente oxidado e reduzido, fazendo com que seja potencialmente danoso, visto, à sua habilidade em gerar espécies reativas e induzir estresse oxidativo celular.

Em vista disso, recentes evidências sugerem que estratégias para controlar os danos causados pelo excesso de ferro podem advir da utilização de antioxidantes naturais, e também de ações preventivas que evitem à sobrecarga deste mineral no organismo (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008; HAZRA; SARKAR; MANDAL, 2013).

---

Os antioxidantes são substâncias que mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem atrasar ou inibir as taxas de oxidação. São moléculas que neutralizam a ação dos RL, aceitando ou doando elétrons para eliminar a condição desemparelhada do radical. As moléculas antioxidantes podem reagir diretamente com os RL e destruí-los (ROCHA, 2007; LÜ et al., 2010).

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes tanto no organismo como nos alimentos ingeridos, respectivamente. No sistema enzimático, estão presentes as enzimas superóxido-dismutase (SOD), glutaciona-peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (ANTUNES-NETO; SILVA; MACEDO, 2005; LÜ et al., 2010). Dos componentes antioxidantes não-enzimáticos destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco e selênio) (ALFIERI; LEUNG; GRACE, 1998; BIACHI; ANTUNES, 1999) vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína) (ROE, 1992), bioflavonóides (genisteína, quercetina) e taninos (catequinas) (PAPAS, 1999; SHAMI; MOREIRA, 2004).

Dentro deste contexto, verifica-se que com o processo de envelhecimento, as defesas do organismo tendem a se tornarem mais frágeis, ou menos eficientes, assim acredita-se, que os idosos poderiam beneficiar-se do consumo de substâncias com propriedades antioxidantes (ESQUENAZI, 2008; SILVA; FERRARI, 2011).

O interesse pela descoberta de substâncias antioxidantes e pelo desenvolvimento de terapias que sejam responsáveis pela redução da produção de RL e por sua vez, redução de danos celulares e patologias, vem crescendo exponencialmente, contudo muitas contribuições nessa linha de pesquisa fazem-se necessárias (VIEIRA et al., 2011).

Dentre estas substâncias, a *Spirulina platensis* tem sido investigada com este objetivo. Trata-se de uma cianobactéria que apresenta elevado conteúdo proteico, é

---

considerada uma das fontes mais ricas de pró-vitamina A (beta-caroteno) além de apresentar altos níveis de vitaminas e outros minerais, compostos fenólicos, ficocianina, ácido gama-linolênico e outros ácidos graxos essenciais (BELAY, 2002). Estes componentes moleculares da *Spirulina platensis* vem sendo relatados por atenuar efeitos do estresse oxidativo. Sua função antioxidante deve-se principalmente à ficocianina seu principal pigmento (BELAY, 2002; KHAN et al., 2005; ESTRADA; BÉSCOS; FRESNO, 2001).

A *Spirulina platensis* apresenta propriedades nutricionais e funcionais e tem sido utilizada em diferentes modelos experimentais, corroborando com resultados efetivos como estimulante ao sistema imunológico (HENRIKSON, 1995; ANDREWS et al., 2010), na inibição da replicação de alguns vírus, no tratamento de cânceres, nas dislipidemias e diabetes, como anti-inflamatório (SHIH et al., 2009; DENG; CHOW, 2010; GRONEVALT, 2012), como redutor de peso, e do perfil lipídico (COLLA; BAISH; COSTA, 2008; BERTOLIN et al., 2009), favorecendo a cicatrização de feridas (BHAT; MADYASTHA, 2001; TONIOLLO et al., 2012), como neuroprotetor e anti-estressor (SHIH et al., 2009; THAAKUR; SRAVANTHI, 2010), em doenças neurodegenerativas (McCARTY; BARROSO-ARANDA; CONTRERAS, 2010), e como antioxidante (BERTOLIN et al., 2009; GUARIENTI; BERTOLIN; COSTA, 2010; DENG; CHOW, 2010; SANTOLIN, 2012).

Outra terapia importante e bastante discutida na atualidade é a dieta sob restrição calórica (RC), definida como uma redução da ingestão calórica abaixo do *ad libitum*, sem desnutrição. Ela é uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas para se estender o tempo de vida em uma variedade de espécies, inclusive mamíferos (BORDONE; GUARENTE, 2005; SKINNER; LIN, 2010; COLMAN et al., 2009).

Nessa linha de estudo, outros autores, investigaram os efeitos da RC em estender o tempo de vida, em diferentes modelos experimentais como roedores (McCAY et al.,

---

1935; WANG, 2007), *Caenorhabditis elegans* (SCHULZ et al. 2007; YUAN et al., 2012), *Drosophila melanogaster* (ZENG, 2011) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SKIMMER; LIN, 2010; KOUBOVA; GUARENTE, 2003; KAEBERLEIN, 2010).

Um estudo de grande relevância para a comunidade científica foi publicado na revista Science, por Colman e colaboradores em 2009. A pesquisa apresenta um estudo longitudinal de 20 anos, utilizando como modelo experimental macacos Rhesus. Os autores concluíram que a terapia de restrição calórica, caracterizada pela redução do consumo de 30 % das calorias diárias, foi capaz de atenuar o surgimento de patologias associadas ao envelhecimento, e ampliar consideravelmente o tempo de vida da espécie estudada. Os estudos de Colman apareceram na mídia como a “prova que faltava” com relação aos benefícios da RC em mamíferos.

Mattson et al. (2012), em investigação científica, divulgaram na Revista Nature (2012), um estudo longitudinal de 23 anos, também utilizando como modelo experimental, macacos Rhesus. Os autores apontaram que uma RC de 30 %, causou efeitos positivos na saúde dos animais pesquisados. Os macacos sob RC apresentaram menores níveis de triacilgliceróis, colesterol e glicemia, especialmente entre os machos, assim como uma incidência significativamente menor de câncer quando comparado ao grupo controle, no entanto os pesquisadores não verificaram aumento do tempo de vida no modelo estudado.

Devido aos mecanismos de atuação da RC na longevidade ainda não estarem devidamente esclarecidos, muitas teorias têm surgido na tentativa de explicar este fenômeno. Dentre essas teorias, destaca-se a teoria molecular dos mecanismos de atuação da RC na longevidade, segundo a qual, muitos dos efeitos da RC parecem ser mediados pela regulação de genes envolvidos no reparo celular, na resistência ao estresse, na proteção contra danos oxidativos, assim como genes responsáveis pela redução nos medidores inflamatórios e na prevenção de algumas alterações da expressão gênica que ocorrem com a idade (GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009).

---

Lin, Defossez e Guarente (2000), evidenciaram uma via de sinalização encontrada em leveduras. Esses autores descobriram que os benefícios da RC na longevidade podem ser mediados pela indução de um gene chamado *Silent Information Regulator 2* (*Regulador de Informação Silenciosa*, ou apenas *sir2*) que codifica uma enzima, a histona desacetilase dependente de NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo), sendo que a superexpressão do gene resulta em prolongamento da vida, enquanto a supressão de *sir2* diminui o tempo de vida útil.

A SIR2 pertence a uma família de enzimas denominadas sirtuínas, que vem recebendo enorme destaque nos últimos anos devido seu envolvimento em diversas funções fisiológicas, no metabolismo, envelhecimento e doenças relacionadas à idade (KAZANTSEV; OUTEIRO, 2012; HAIGIS; GUARENTE, 2006; HAIGIS; SINCLAIR, 2010).

De acordo com Lin et al. (2002), a restrição calórica não pode estender o tempo de vida quando a *sir2* está ausente, uma vez que células deletadas ao gene *sir2* acumulam alterações cromossômicas no DNA que são responsáveis pela redução da sobrevivência celular. Entretanto, para Kerberlein (2010), a hipótese de que a *sir2* contribui para a extensão do tempo de vida, quando organismos modelos são submetidos à restrição de calorias é ainda controversa.

A expressão do gene *sir2* e a atividade destas enzimas nos tecidos são fortemente afetadas por mudanças no ambiente como dieta e estilo de vida. Alguns fatores reportados por influenciarem a expressão destes genes incluem: RC, exercícios físicos, álcool, fumo, estresse oxidativo, administração de compostos antioxidantes como resveratrol, quercetina e melatonina (KELLY, 2010).

Diferentes autores sugerem que a modulação das sirtuínas seja no futuro, um possível caminho para aliviar os efeitos e complicações do envelhecimento como a diabetes, o câncer, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (MICHAN;

---

SINCLAIR, 2007; WESTPHAL et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2007; GAN et al., 2008; MILNE et al., 2008; OUTEIRO et al., 2008; GUARENTE, 2008; KAEBERLEIN 2008).

Estudos realizados com diferentes modelos experimentais como leveduras, *Drosophilas* e roedores têm permitido a identificação de alguns processos que contribuem ao esclarecimento dos mecanismos do envelhecimento. As células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas em larga escala para estudos dos fenômenos da bioquímica, biologia celular e molecular, caracterizando-se como um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para tais estudos. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica e de detoxificação. Apesar das diferenças de complexidade entre leveduras e humanos, o estudo do envelhecimento em leveduras tem mostrado informações importantes em vias que modulam este processo, podendo ser reportadas para os mamíferos (PIPER, 2006; MANNARINO et al., 2008; KAEBERLEIN, 2010; MILLER-FLEMING; GIORGINI; OUTEIRO, 2008).

Dentro deste contexto, objetivou-se demonstrar os efeitos da restrição calórica e do extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de células de *Saccharomyces cerevisiae* deletadas ao gene *sir2*.

Para tanto, a presente dissertação está apresentada da seguinte forma: a introdução pontua questões de revisão de literatura, abordando conceitos referentes ao assunto em questão; a produção científica I apresenta o artigo que discute os achados da pesquisa desenvolvida. Após seguem as considerações finais da dissertação onde se descreve de forma abrangente as conclusões, bem como, as recomendações e sugestões para trabalhos futuros.

## 2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA I

### RESTRIÇÃO CALÓRICA E EXTRATO DE *Spirulina Platensis* FRENTE AO ÍON FERROSO ( $\text{Fe}^{2+}$ ) NO ENVELHECIMENTO DE CÉLULAS DE *Saccharomyces Cerevisiae* DELETADAS AO GENE *Sir2*

Fábia Benetti<sup>1</sup>; Tiago Fleming Outeiro<sup>2</sup>; Telma Elita Bertolin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Pesquisa em Neurodegeneração Restauradora, Centro de Fisiologia Molecular do Cérebro, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Alemanha.

#### Resumo

O envelhecimento é acompanhado por mudanças na atividade de células, tecidos e órgãos. O acúmulo progressivo destas alterações tem sido associado ao desequilíbrio do organismo em relação a determinados metais, com ênfase ao ferro. Terapias antioxidantes podem interferir neste processo, reduzindo os danos causados pelo ferro. A *Spirulina platensis* apresenta propriedades como antioxidante, verificada em modelos *in vivo* e *in vitro*. A restrição calórica (RC) tem sido relatada por reduzir a incidência de patologias e prolongar o tempo de vida em diversos modelos experimentais. Seus benefícios podem estar relacionados com a ativação do gene *sir2*. Neste contexto, objetivou-se determinar os efeitos do extrato de *Spirulina platensis* e da RC frente ao íon ferroso no envelhecimento da *Saccharomyces cerevisiae* deletadas ao gene *sir2Δ*. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* WT e *sir2Δ*, crescidas em meio YPD 2 % glicose e YPD 0,5 % glicose (RC), foram expostas ou não a 0,8 mg/mL de extrato de *Spirulina platensis* e a 1mM de  $\text{Fe}^{2+}$ . Após procederam-se análises de viabilidade celular e

---

lipoperoxidação. Os resultados mostraram redução da sobrevivência celular na deleção de *sir2Δ*. Verificou-se resultados estatisticamente significativos antes do envelhecimento para os tratamentos Padrão, RC, RC+Fe<sup>2+</sup> e após o envelhecimento para os tratamentos Padrão, Extrato de *Spirulina platensis*, RC, Extrato de *Spirulina platensis* + Fe<sup>2+</sup>, RC+Fe<sup>2+</sup>. A lipoperoxidação foi aumentada na deleção de *sir2Δ*, tanto antes quanto após o envelhecimento para os diferentes tratamentos. Neste contexto, verificamos que a deleção do gene *sir2Δ* diminui a sobrevivência celular e aumenta a peroxidação lipídica, quando comparada à cepa WT, em todos os tratamentos. Ainda podemos concluir que as terapias utilizadas mostraram efeito protetor frente ao íon ferroso.

Palavras-chave: Antioxidantes. *Spirulina platensis*. Restrição calórica. Sirtuínas. Ferro.

#### Abstract

Aging is followed by changes in cell activities, tissue and organs. The progressive accumulation of these changes has been associate with imbalance of the organism in relation to some metals with emphasis on iron. Antioxidant therapies may take part in this process reducing damages caused by iron the *Spirulina platensis* has antioxidant properties observed in "in alive" and "in vitro" models. Caloric restriction (CR) has been related to reduce the incidence of pathologies and prolong the lifetime in several experimental models. Benefits may be connected to the activation of gene *sir2*. In this context, the objective was to determine the effects of the extract of *Spirulina platensis* and of RC front of the ferrous ion in *Saccharomyces cerevisiae* aging deleted the gene *sir2Δ*. Strains *Saccharomyces cerevisiae*, WT and *sir2Δ* grown in YPD 2 % glucose and YPD 0,5 % glucose (CR) were exposed or not to 0,8mg/ml of *Spirulina platensis* extract and 1mM of Fe<sup>2+</sup>. After analysis of cell viability and lipid peroxidation were done. The results showed reduced cell survival in the absence of *sir2Δ*. There was important results before aging to standard treatment, RC, RC +Fe<sup>2+</sup> and after aging to standard

---

treatment, *Spirulina platensis* extract, RC, *Spirulina platensis* extract + Fe<sup>2+</sup> + Rc + Fe<sup>2+</sup>. The lipid peroxidation was increased in the absence of *sir2Δ* both before and after the aging for all treatments. The deletion of *sir2Δ* decreased cell survival and increased lipid peroxidation. Therapy used showed protective effects against ferrous ion.

Keywords: Antioxidants. *Spirulina platensis*. Caloric Restriction. Sirtuins. Iron.

## 2.1 Introdução

Com o 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 podem causar diminuição 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).

A teoria dos radicais livres (RL), proposta por Harman em 1956, estabelece que o envelhecimento advém de efeitos deletérios às organelas celulares, causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERNS) (AFANAS'EV, 2010), sendo que o acúmulo de lesões moleculares provocadas por estas espécies, nos componentes celulares ao longo da vida, podem conduzir à perda de funcionalidade e ao desenvolvimento de doenças (RATTAN, 2006; GEMS; PARTRIDGE, 2013).

---

Os RL estão constantemente sendo produzidos nas células através de processos metabólicos normais. A formação de RL ocorre durante a transferência de elétrons no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração de RL pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares tem sido chamado de estresse oxidativo (SAMPAIO; MORAES, 2010; LEADSHAM et al., 2010).

Os metais de transição como o ferro e o cobre, podem doar ou aceitar elétrons durante reações intracelulares, catalisando a formação de RL. O ferro em sua forma ferrosa é quimicamente uma fonte irrefutável de estresse oxidativo porque ele é capaz de formar radicais livres via reação de Fenton (GILCA et al., 2007; BATISTA-NASCIMENTO et al., 2012).

Danos oxidativos em biomoléculas e o acúmulo de ferro em áreas do cérebro vêm sendo evidenciado como o principal aspecto patológico de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e Alzheimer (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008). Desta forma, verifica-se um novo olhar da ciência sobre o papel deste mineral no organismo, pois há décadas os estudos evidenciam as carências do ferro e o desenvolvimento de anemia ferropriva, como um problema de saúde pública (FRANCESCHIINI, 2011).

Entretanto, o que se sabe na atualidade é que o ferro é um elemento altamente reativo, com capacidade para ocupar múltiplos estados de oxidação, estando estes subjacentes tanto a sua utilidade como um cofator, quanto ao seu potencial para toxicidade (NÚNEZ et al., 2012).

Devido ao envolvimento do ferro na produção de radicais livres, a quelatação deste metal ou a sua privação controlada tem sido apontada como uma terapia alternativa para as patologias associadas ao estresse oxidativo e envelhecimento (SIQUEIRA;

---

ALMEIDA; ARRUDA, 2006). 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 (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008).

Dentre os antioxidantes naturais, a cianobactéria *Spirulina platensis* recebe interesse nas investigações científicas, devido o seu potencial nutritivo e capacidade antioxidante (WU et al., 2011). Tem sido utilizada 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 et al., 2001), como anti-inflamatório (SHIH et al., 2009) como redutor de peso (PAIVA; ALFENAS; BRESSAN, 2007) e como neuroprotetora (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008).

Outra terapia importante e bastante discutida na atualidade é a dieta sob restrição calórica (RC), definida como uma redução da ingestão calórica 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).

Os mecanismos pelos quais a RC aumenta a longevidade e reduz ou retarda a incidência de doenças associadas ao envelhecimento ainda é incerto. Inúmeras hipóteses têm surgido na tentativa de explicar este fenômeno (GENARO; SARKINS; MARTINI, 2009).

Alguns estudos relatam que a dieta sobre RC contribui com a longevidade em razão da menor geração de EROS. 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).

Recentes achados científicos mostram que os benefícios da RC no envelhecimento estão associados à indução de um gene *Silent Information Regulator 2* pertencente a família de proteínas sirtuínas (KAEBERLEIN, 2010; NAKAGAWA; GUARENTE, 2011). Estudos apontam que proteínas SIR2 podem através da RC regular a longevidade, aumentando níveis de NAD<sup>+</sup> (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) disponíveis, sendo que a superexpressão do gene resulta em prolongamento da vida enquanto a supressão de SIR2 diminui o tempo de vida útil (ALMEIDA, 2007, HERRANS; SERRANO, 2010).

Entretanto, este resultado é ainda controverso, pois estudos indicam que o prolongamento da vida via RC não depende da presença da sirtuína 2 (LAMMING et al., 2005; KAEBERLEIN et al., 2004). Para Outeiro et al. (2007) a inibição da SIRT2 em células neuronais humanas pode proporcionar um meio de intervenção terapêutica na Doença de Parkinson (DP). Na DP a deleção da SIRT2 resulta na redução do acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína nos corpos de Lewy, com menor perda de neurônios dopaminérgicos.

Diante destas perspectivas em relação ao processo de envelhecimento, buscamos investigar o papel do extrato de *Spirulina platensis* e da restrição calórica frente ao íon ferroso (Fe<sup>2+</sup>) em células de *Saccharomyces cerevisiae* deletas ao gene *sir2Δ*.

## 2.2 Metodologia

### 2.2.1 Teste de citotoxicidade do extrato de *Spirulina platensis*

Dados da literatura científica demonstram que concentrações de extrato de *Spirulina platensis* que variam de 0,1 a 0,5 mg/mL demonstram-se protetoras contra o

---

estresse oxidativo em células de *Saccharomyces cerevisiae* (BOUSSIBA; RICHMOND, 1979). Para tal, optamos por expor as células de *S. cerevisiae*, controle (WT) a concentrações crescentes de extrato de *Spirulina platensis* (0,08-0,8 mg/mL). As células foram incubadas a 28 °C com agitação constante de 160 rpm durante 1 h. Após coletou-se 400 µg de células e procederam-se as diluições adequadas para realização do plaqueamento. As colônias foram contadas depois de 72 h do cultivo em estufa a 28 °C. O percentual de tolerância foi calculado a partir da razão entre o número de colônias obtidas antes e após a exposição à droga (DANI et al., 2008).

### 2.2.2 Teste de citotoxicidade do íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ )

As concentrações do íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) utilizadas em nossos ensaios foram baseadas em estudos científicos sobre estresse por metais em *Saccharomyces cerevisiae*, nos quais se empregou concentrações que variaram de 0,05 mM a 5 mM (SILVA; BASSO, 2004, LAUER JÚNIOR, 2007). Para tal, células de *Saccharomyces cerevisiae* WT (wild type) crescidas até a metade da fase exponencial em YPD 2 % foram expostas a concentrações crescentes de sulfato ferroso (0,5 mM, 1 mM e 4mM). Em seguida as células foram submetidas à temperatura de 28 °C e 160 rpm durante 1 h. Posteriormente, foram coletados 400 µg de células e após fez-se diluições adequadas para o processo de plaqueamento. As colônias foram contadas depois de 72 h de cultivo, em estufa a 28 °C. Calculou-se o percentual de tolerância pela razão entre o número de colônias obtidas antes e após a exposição ao  $\text{Fe}^{2+}$ .

### 2.2.3 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e as condições de crescimento

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas foram WT cepa BY4741 (MATa; his3; leu2; met15; ura3) e mutante de SIR2 isogênica a BY4741 exceto ao gene *sir2Δ*, obtidas da Euroscarf, Frankfurt, Alemanha. Os estoques de todas as cepas foram mantidos em meio YPD a 2 % sólidos (1 % extrato de levedura, 2 % de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar), em condições adequadas para evitar a seleção de supressores.

---

No caso das estirpes mutantes, os meios também continham 0,02 % de geneticina. Para o desenvolvimento dos experimentos, as células foram cultivadas até metade da fase exponencial (0,8 mg de peso seco/ml) em meio YPD 2 % ou 0,5 % líquido à 28 °C e 160 rpm, com proporção média de volume no frasco de 5:1.

#### 2.2.4 Sobrevivência celular antes e após os tratamentos adaptativos

As células de levedura foram inoculadas em meio fresco, YPD 2 % de glicose e YPD 0,5 % de glicose (RC), contendo ou não 0,8 mg/mL de extrato de *Spirulina platensis* e incubadas, durante 1 h a 28 °C/160 rpm. Ambas as culturas, foram expostas a 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  nas mesmas condições. A viabilidade celular foi analisada por plaqueamento, em triplicata, em meio YPD sólido, após diluição adequada. As placas foram incubadas a 28 °C durante 72 h, e então submetidas à contagem. A sobrevivência celular foi expressa como percentagem de células viáveis que sobrevivem antes e após a exposição aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis* e íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

#### 2.2.5 Simulação do envelhecimento cronológico

Após a realização dos tratamentos adaptativos com íon ferroso e extrato de *Spirulina platensis*, as células foram expostas ao processo de envelhecimento cronológico. Este consiste da suspensão de 30 mg de células que foram coletadas e lavadas duas vezes com água destilada estéril. Após a última lavagem, o centrifugado foi ressuspenso em 10 mL de água estéril e incubado a 37 °C/160 rpm por 24 h. A sobrevivência celular foi expressa como percentagem de células viáveis que sobrevivem antes e após ao processo de envelhecimento (ELEUTHERIO et al., 1995).

#### 2.2.6 Detecção de peroxidação lipídica

Para a determinação da peroxidação lipídica foram recolhidas por centrifugação cerca de 50 mg de células antes e após 1h e 24h de exposição à 1mM de  $\text{Fe}^{2+}$ , e

---

exposição à 0,8 mg/mL de extrato de *Spirulina platensis*. Após a centrifugação as células foram lavadas duas vezes com água destilada gelada. As células foram então ressuspensas em 0,5 mL de tricloroacético a 10 % (w/v), e para a precipitação das proteínas foi adicionado 1,5 g de esferas de vidro, objetivando o rompimento celular. As amostras foram submetidas à lise por seis ciclos de 20 s, com agitação em vórtice, seguido de 20 segundos sob gelo. Os extratos foram centrifugados a 2000 g durante 3 min. O sobrenadante foi misturado com 0,1 mL de EDTA 0,1 M e 0,6 mL de 1% (w/v) de ácido tiobarbitúrico a 0,05 M NaOH. A mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 min e a absorbância das amostras foi submetida medida a 532 nm.

### 2.2.7 Análise estatística

Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram testadas utilizando ANOVA e o teste de t de Student. O último denota homogeneidade entre os grupos experimentais a 5 % de significância ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Teste de citotoxicidade do extrato de *Spirulina platensis*

A Figura 1 apresenta os resultados do teste de citotoxicidade do extrato de *Spirulina platensis*, representando as médias  $\pm$  desvio padrão do percentual de sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa controle (WT). Podemos observar que as concentrações de 0,08, 0,4 e 0,8 mg/mL testadas não causaram toxicidade para as células de levedura. Diante desse resultado escolhemos a concentração de 0,8 mg/mL, ou seja, a maior concentração estudada, para a condução dos experimentos.

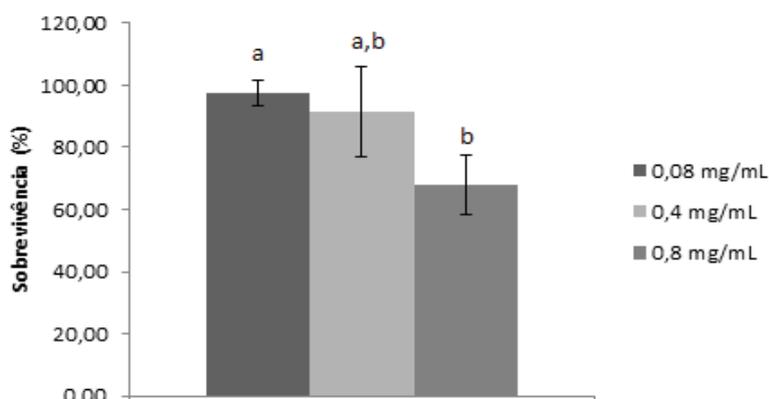


Figura 1. Resultados do percentual de sobrevivência celular de células de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa *WT*, submetidas a diferentes concentrações do extrato de *Spirulina platensis*. Os percentuais de sobrevivência foram calculados a partir da razão da concentração de células viáveis obtidas após (1h) e antes (0 h) da exposição ao extrato de *Spirulina platensis*. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes.

### 2.3.2 Teste de citotoxicidade do íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ )

A Figura 2 apresenta os resultados do teste de citotoxicidade do íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), representando as médias  $\pm$  desvio padrão do percentual de sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa controle (*WT*). Verificamos que as concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizadas (0,5 mM, 1 mM e 4mM) diminuíram significativamente ( $p < 0,05$ ) a sobrevivência celular.

A partir desses resultados, optamos por utilizar a concentração de 1 mM, visto que, nesta concentração a tolerância foi moderada e não letal quando comparada a concentração de 4 mM após 1 h de exposição ao íon ferroso. Verificamos que a concentração de 4 mM de ferro é danosa ao ponto de interferir na multiplicação e sobrevivência celular.

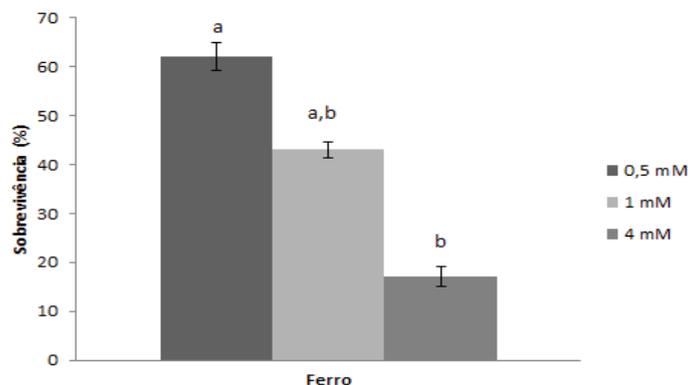


Figura 2. Resultados da sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* WT submetidas a diferentes concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$ . O percentual de sobrevivência celular foi calculado a partir da razão da concentração de células viáveis obtida após (1 h) e antes (0 h) de exposição ao íon ferroso. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes.

### 2.3.3 Sobrevivência celular

A sobrevivência celular foi verificada através do percentual de células viáveis (percentual de sobrevivência) antes e após o envelhecimento, conforme metodologia descrita.

Buscamos avaliar se a deleção de *sir2* interfere na extensão do tempo de vida de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), e as terapias de RC e extrato de *Spirulina platensis*. Para tal, utilizamos a cepa controle (WT) e mutante que é deficiente ao gene *sir2*.

A Figura 3 A e B mostram os resultados de sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* referente à comparação da cepa WT e *sir2Δ* submetidas aos tratamentos Padrão, extrato de *Spirulina platensis*, Restrição calórica,  $\text{Fe}^{2+}$ , Extrato de *Spirulina platensis*+  $\text{Fe}^{2+}$  e Restrição calórica +  $\text{Fe}^{2+}$ , antes do envelhecimento (Figura 3 A) e após o envelhecimento (Figura 3 B).

Observamos na Figura 3A que a cepa *sir2Δ* em comparação com a cepa controle (WT), apresentou uma redução no percentual de sobrevivência celular, quando submetidas aos tratamentos estudados (Padrão, Extrato de *Spirulina platensis*, RC,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  + Extrato de *Spirulina platensis*,  $Fe^{2+}$  + RC) antes do envelhecimento. Este efeito foi significativo ( $p < 0,05$ ) para os tratamentos: Padrão ( $p = 0,022$ ), Restrição calórica ( $p = 0,027$ ) e Restrição calórica +  $Fe^{2+}$  ( $p = 0,009$ ).

Queremos aqui ressaltar que este comportamento também foi observado nos demais tratamentos, Extrato de *Spirulina platensis*,  $Fe^{2+}$  e Extrato de *Spirulina platensis* +  $Fe^{2+}$ , porém a redução no percentual de sobrevivência celular quando da comparação das duas cepas (WT e *sir2Δ*) não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

Ao considerarmos a ausência de significância nos tratamentos acrescidos de Extrato de *Spirulina platensis*, antes do envelhecimento, podemos sugerir um papel benéfico da cianobactéria, pois mesmo na ausência de *sir2Δ*, a contagem de células viáveis foi semelhante à cepa controle, isso também foi observado na presença do íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ) (Figura 3A).

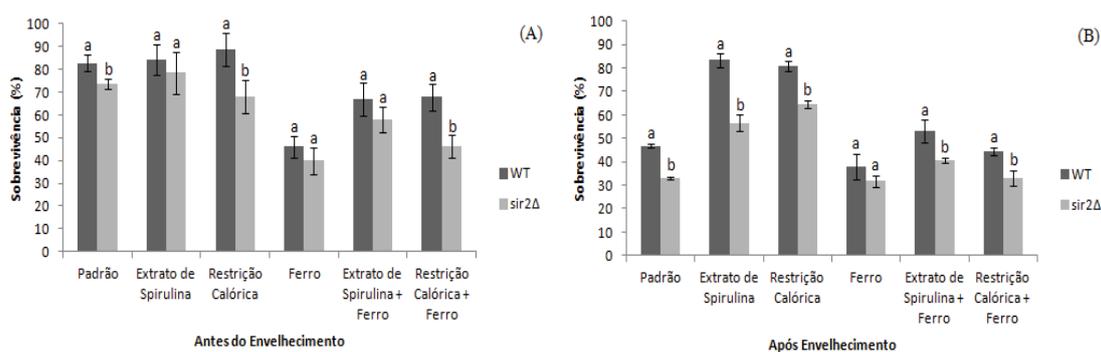


Figura 3. Resultados de sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* cepas controle (WT) e mutante *sir2Δ* submetida ou não aos tratamentos adaptativos com extrato de *Spirulina platensis*, RC e  $Fe^{2+}$ . A sobrevivência foi expressa como a percentagem de unidades formadoras de colônias antes do envelhecimento (A) e após 24 h de envelhecimento (B). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

---

Os resultados do percentual de sobrevivência celular após o processo de envelhecimento (24h) estão apresentados na Figura 3B. Observamos que a cepa deletada ao gene *sir2Δ* apresentou uma redução na contagem de células viáveis quando comparada a controle (WT). Este efeito foi significativo ( $p < 0,05$ ) para os tratamentos Padrão ( $p = 0,001$ ), Extrato de *Spirulina platensis* ( $p = 0,001$ ), Restrição calórica ( $p = 0,01$ ), Extrato de *Spirulina platensis* +  $Fe^{2+}$  ( $p = 0,045$ ), Restrição calórica +  $Fe^{2+}$  ( $p = 0,006$ ). Também verificamos para o tratamento com o íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ) comportamento semelhante, porém a redução no percentual de sobrevivência celular não foi significativa.

Queremos ressaltar que as cepas estudadas (WT e *sir2Δ*) quando tratadas com o íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ) apresentaram redução na sobrevivência celular nos dois tempos estudados, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as cepas ( $p > 0,05$ ). Entretanto, quando as terapias de RC e extrato de *Spirulina platensis* foram aplicadas à sobrevivência celular aumentou em ambas as situações estudadas (antes e após o envelhecimento). Com esse resultado podemos ressaltar o papel protetor destas terapias (RC e extrato de *Spirulina platensis*) na atenuação de danos induzidos pelo  $Fe^{2+}$  em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Desta forma verificamos nesta análise, a resposta moduladora da proteína SIR2, na sobrevivência celular. Observamos que SIR2 desempenha papel importante para o prolongamento da vida de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Sendo que a sua supressão encontrou-se estreitamente relacionada à diminuição da sobrevivência celular em todas as situações estudadas.

#### 2.3.4 Peroxidação Lipídica

A Figura 4 apresenta os resultados da análise de peroxidação lipídica através do método TBARS (Teste de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), antes e após o envelhecimento.

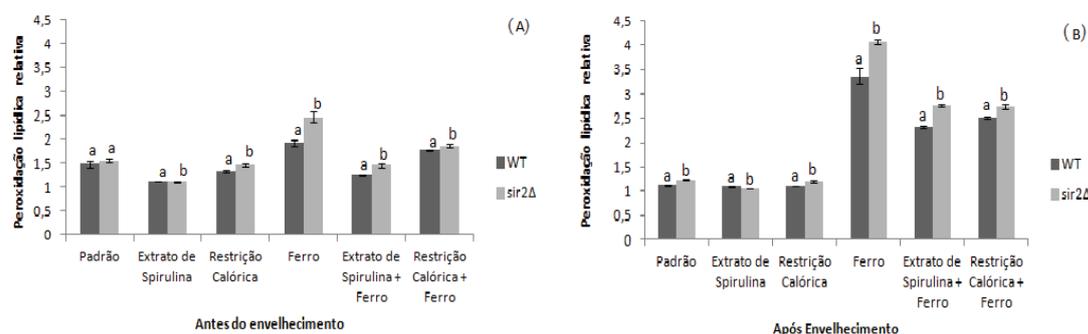


Figura 4. Resultados da peroxidação lipídica celular de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle (WT) e mutante *sir2Δ* submetida ou não aos tratamentos com extrato de *Spirulina platensis*, RC e  $Fe^{2+}$ . A peroxidação lipídica foi medida antes do envelhecimento (A) e após 24 h de envelhecimento (B). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio de pelo menos três experimentos independentes.

A Figura 4 A nos mostra que a cepa deletada ao gene *sir2Δ* apresentou uma maior peroxidação lipídica em comparação com a WT antes do envelhecimento. Este efeito foi significativo ( $p < 0,05$ ) para os tratamentos Extrato de *Spirulina platensis* ( $p = 0,006$ ), Restrição calórica ( $p = 0,006$ ),  $Fe^{2+}$  ( $p = 0,002$ ), Extrato de *Spirulina platensis* +  $Fe^{2+}$  ( $p = 0,00$ ) e Restrição calórica +  $Fe^{2+}$  ( $p = 0,015$ ).

Analisando a Figura 4 A, a peroxidação lipídica antes do envelhecimento, podemos observar que embora a lipoperoxidação tenha sido maior em células de *Saccharomyces cerevisiae* deletadas ao gene *sir2Δ*, quando ambas as cepas (WT e *sir2Δ*) foram submetidas aos tratamentos com Extrato de *Spirulina platensis* +  $Fe^{2+}$  e RC +  $Fe^{2+}$  a oxidação lipídica foi diminuída quando comparado ao tratamento que contém apenas  $Fe^{2+}$ . Com maior destaque para os tratamentos acrescidos de Extrato de *Spirulina platensis*.

A Figura 4 B mostra os resultados da peroxidação lipídica após 24 h de envelhecimento. Percebe-se que na maioria dos tratamentos (Padrão ( $p = 0,001$ ), Restrição calórica ( $p = 0,001$ ),  $Fe^{2+}$  ( $p = 0,02$ ), Extrato de *Spirulina platensis* +  $Fe^{2+}$  ( $p = 0,001$ ), Restrição calórica +  $Fe^{2+}$  ( $p = 0,002$ )) a cepa deletada ao gene *sir2Δ* apresentou

---

maior lipoperoxidação quando comparada a cepa WT, sendo que este comportamento foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

Observamos que as terapias com Extrato de *Spirulina platensis* e as terapias de RC quando expostas ao  $Fe^{2+}$  foram capazes de diminuir a peroxidação lipídica em ambas as cepas estudadas, também após o envelhecimento, com maior destaque para a redução da peroxidação lipídica pelo extrato de *Spirulina platensis*. Com base nesses resultados, podemos perceber a influência da proteína SIR2 nos níveis de peroxidação lipídica em *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 2.4 Discussão

Devido à elevada reatividade o ferro torna-se potencialmente tóxico uma vez que catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio, transferindo um elétron para o oxigênio molecular ( $O_2$ ), produzindo o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que é o precursor do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (ANDREWS, 2000). Esse último, o  $H_2O_2$ , por sua vez, reage com o  $Fe^{2+}$  gerando o potente radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), através da reação de Fenton (HALLIWELL et al., 1992). Tais espécies radiculares podem promover a oxidação de diversas moléculas e organelas promovendo danos celulares.

Buscando esta relação, em nosso trabalho, observamos que o íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ) na quantidade utilizada (1 mM) comportou-se como uma substância reativa, causando redução no percentual da sobrevivência celular e aumento da peroxidação lipídica nas cepas estudadas (WT e *sir2Δ*). A inibição do crescimento celular encontrada nas cepas submetidas exclusivamente ao  $Fe^{2+}$  evidencia a capacidade de toxicidade deste íon, sendo responsável por danos aos componentes celulares.

A importância de se estudar os danos induzidos pelo ferro, vem ao encontro da literatura científica que reporta os efeitos deletérios do acúmulo desse íon, bem como, a sua relação com diversos processos patológicos incluindo, doenças hepáticas (KUDO et

---

al., 2008) cardíacas (RAMIREZ et al., 2012) câncer (CHOI et al., 2008), anormalidades do sistema imunológico, diabetes (VAN CAMPENHOUT et al., 2008), doença de Parkinson (SHENEIDER; BHATIA, 2012) doença de Alzheimer (CASTELANI et al., 2007) doença de Huntington (BARTZOKIS; TISHLER, 2000) e envelhecimento precoce (MESQUITA et al., 2012).

O ferro é um dos micronutrientes mais estudados e melhor descritos na literatura, devido se tratar do mineral mais abundante nos sistemas biológicos, e importante em diversas funções do organismo (FERNANDEZ et al., 2007; SHEFTEL; MASON; PONKA, 2012). A deficiência de ferro é um fator prejudicial e continua sendo visto como um problema de saúde pública a ser enfrentado pelos países, principalmente os subdesenvolvidos (BATISTA; SOUZA; BRESANI, 2008).

Se a carência de ferro traz danos à saúde, sabe-se na atualidade, que o excesso deste metal, bem como, o acúmulo de ferro no organismo também são fatores prejudiciais (NUNÉZ et al., 2012). Estudos voltam seus olhares para os danos causados pelo ferro, devido ao envolvimento deste, na formação de radicais livres, associação com processos patológicos e acúmulo de ferro nos tecidos, alertando para sua toxicidade (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006).

Embora exista um eficiente mecanismo molecular mediado pelo próprio status de ferro que regula sua absorção e armazenamento mantendo a homeostase do íon no organismo (CRICHTON et al., 2002), situações de ingestão elevada de alimentos ricos em ferro na dieta (FLEMING et al., 2002) fatores hereditários, repetidas transfusões sanguíneas (SEBASTIANI; PANTOPOULOS, 2011) e outras condições patogênicas (LIU et al., 2009), ou ainda, a deficiência de outros micronutrientes, podem interferir nessa homeostase, resultando no acúmulo de ferro tecidual (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006).

---

Estratégias para controlar os danos causados pelo íon ferroso podem advir de condições preventivas que evitem à sobrecarga do metal no organismo, protegendo assim as moléculas funcionais (lipídios, proteínas, DNA) da oxidação (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008; DAIRAM et al., 2008).

Neste contexto, verificamos que as terapias utilizadas neste estudo desempenharam um papel protetor contra os danos induzidos pelo ferro, proporcionando aumento da sobrevivência celular. Sendo este fato evidente, quando comparamos os tratamentos de  $Fe^{2+}$  + RC e  $Fe^{2+}$  + Extrato de *Spirulina platensis* com as células expostas de forma exclusiva ao íon ferroso antes e após o envelhecimento. Podemos também sugerir que o Extrato de *Spirulina platensis* mostrou comportamento similar à RC, ou mimetismo a RC.

A busca por substâncias miméticas a restrição calórica vem crescendo exponencialmente, devido ao fato da dificuldade do ser humano manter um estilo de vida sobre RC em longo prazo. Esses estudos vêm elucidando os efeitos de diversas substâncias com este potencial. De acordo com Baur (2010) o resveratrol é um composto capaz de produzir efeitos benéficos através do mesmo mecanismo da RC.

Outros estudos também retratam o mimetismo existente entre a utilização do resveratrol e da RC. Bass (2007) estudando o modelo *Drosophila melanogaster* verificou mimetismo entre as terapias no aumento do tempo de vida e da fecundidade. Wood et al. (2004) constataram efeitos miméticos em *Caenorhabditis elegans* na ativação de SIR2 e no aumento do tempo de vida do modelo em questão. Kaeberlein et al. (2005) em estudo com leveduras verificou mimetismo do resveratrol com a RC no retardo do envelhecimento e ativação de sirtuínas.

Konraht (2011) realizou um estudo com objetivo de investigar a cianobactéria *Spirulina platensis* como possível mimetizadora da RC no envelhecimento de roedores

---

verificou que o uso da *Spirulina platensis* reduziu os níveis de triacilgliceróis, colesterol e peroxidação lipídica, mimetizando os efeitos obtidos pela restrição calórica.

No presente estudo também foi possível observar na análise de sobrevivência celular (Figura 3 A e B), que a deleção de *sir2Δ* mostrou-se prejudicial às células de *Saccharomyces cerevisiae*, quando comparamos a cepa deletada ao gene *sir2Δ* com o seu controle. Este achado foi significativo para os tratamentos Padrão, RC, e RC + Fe<sup>2+</sup> antes do envelhecimento e Padrão, Extrato de *Spirulina platensis*, RC, Extrato de *Spirulina platensis* + Fe<sup>2+</sup> e RC + Fe<sup>2+</sup> após o envelhecimento.

Segundo Imai (2013) a descoberta de que a proteína SIR2 estaria relacionada à extensão do tempo de vida em leveduras, vermes e moscas, instiga a curiosidade de cientistas, que tentam responder a perguntas de como as sirtuínas promovem e protegem o organismo do envelhecimento e de desordens associadas a esse processo.

A SIR2 foi à primeira proteína sirtuína descrita por atuar no prolongamento da vida. Em leveduras SIR2 é um dos principais determinantes da longevidade, tendo em vista que o aumento da expressão deste gene pode influenciar no prolongamento da vida (KABERLEIN et al., 1999; HAIGIS; GUARENTE, 2006). Kaeberlein (2010) em estudos sobre o envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* evidenciou que a presença do gene *sir2* era responsável pela extensão da expectativa de vida em 50%, enquanto que a deleção de SIR2 reduzia a longevidade.

Estudos em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* reportam a proteína SIR2 como um regulador importante do ciclo celular e resistência ao estresse (MICHISHITA et al., 2008). Segundo Yamamoto, Schoonjans e Auwerx (2007), cepas de levedura com níveis anormais de SIR2 mostram defeitos em várias funções celulares, incluindo transcrição, recombinação e reparo do DNA.

---

O *sir2* vem sendo apresentado na literatura científica como um gene determinante no prolongamento da vida. Alguns achados científicos mostram que os benefícios da RC na longevidade podem estar relacionados à ativação deste gene (KAEBERLEIN et al., 2004; KABERLEIN, 2010; NAKAGAWA; GUARENTE, 2011).

Nosso interesse em avaliar os níveis de peroxidação lipídica se deu pelos achados científicos que mostram que a conversão oxidativa de ácidos graxos em peróxidos lipídicos pode danificar as membranas biológicas, levando ao dano tecidual, estando relacionada com patologias do processo de envelhecimento (POTTER; NEUN; STERN, 2011).

Os danos oxidativos da peroxidação lipídica vêm sendo descritos como uma das causas à toxicidade induzida pelo ferro. O íon ferroso também tem sido evidenciado por Durfinová et al. (2012) no aumento da formação de espécies reativas de oxigênio.

Observamos que as células de *Saccharomyces cerevisiae* (WT e *sir2Δ*) quando expostas ao íon ferroso apresentaram aumento da peroxidação lipídica. Estudos tem demonstrado que existe relação entre estoques elevados de ferro e aumento do estresse oxidativo. Dal-Pizzol et al. (2001) observaram que a exposição de ratos a doses elevadas de ferro aumenta as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como, observou-se redução da atividade da enzima superóxido dismutase.

Os nossos resultados também evidenciaram que as cepas deletadas ao gene *si2Δ* apresentaram maior peroxidação lipídica quando comparadas com as cepas controle (WT) nos dois tempos estudados. Para Fabrizio e Longo (2005) as proteínas SIR2 podem regular a produção de espécies reativas de oxigênio e o envelhecimento celular.

Quando avaliamos a peroxidação lipídica frente às terapias estudadas (Extrato de *Spirulina platensis* e RC), antes e após o envelhecimento, verificamos efeitos benéficos

---

das mesmas frente ao íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nas cepas estudadas. Podemos ainda verificar pela análise dos resultados que o Extrato de *Spirulina platensis* foi superior a RC no combate a lipoperoxidação.

Os estudos de Bermejo; Pinero e Villar (2008) e Estrada, Bésco e Fresno (2001) demonstram que a *Spirulina platensis* é um potente eliminador de radicais livres, tendo a capacidade de inibição da peroxidação lipídica microssomal. Estudos de Deng e Chow (2010) 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 outra terapia utilizada neste estudo foi a RC, uma hipótese provável para o mecanismo pelo qual RC previne a peroxidação lipídica é a de que esse processo diminui a geração de EROS e, dessa forma, a oxidação de lesões em componentes celulares (GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009; BAUR, 2010). A RC promove uma mudança metabólica resultando em um transporte de elétrons mais eficiente na cadeia respiratória mitocondrial. Um transporte de elétrons mais rápido e mais eficiente pode levar a uma produção menor de RL pela mitocôndria, uma das maiores fontes de EROS intracelulares (BAUR, 2010).

Reverter-Branchat et al. (2010) evidenciam que o envelhecimento de leveduras pode ser explicado, em partes, por mudanças do dano oxidativo a proteínas específicas, produzidas por situações de estresse no interior das células. Assim, a RC pode abrandar o envelhecimento, podendo ser atribuída a uma melhor adaptação de células para resistir a situações de estresse.

Apesar dos rápidos avanços na biologia das sirtuínas, ainda não há ferramentas para a precisão dos efeitos da atividade destas *in vitro* e *in vivo*. Diferenças em dados encontrados nas pesquisas revelam um cenário complicado trazendo a tona o fato de que há muitas informações desconhecidas quanto à função das sirtuínas. Partes desses

---

conflitos incluem a interpretação de quando as sirtuínas estão ativadas. Questões importantes necessitam ser elucidadas para melhorar a compreensão dos mecanismos das sirtuínas e seu potencial terapêutico (HAIGIS; SINCLAIR, 2010).

## 2.5 Conclusões

As células de *Saccharomyces cerevisiae* quando expostas ao íon ferroso apresentam diminuição da sobrevivência celular e aumento da peroxidação lipídica.

As células de *Saccharomyces cerevisiae* deletadas ao gene *sir2Δ* mostraram diminuição da sobrevivência celular e aumento da peroxidação lipídica.

As terapias de RC e Extrato de *Spirulina platensis* quando aplicadas as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* controle e deletadas ao gene *sir2*, atenuaram a ação do íon ferroso, aumentando a sobrevivência celular e diminuindo a peroxidação lipídica.

## 2.6 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.

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.

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

ANDREWS, N. C. Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 1, p. 75-98, 2000.

---

BARTZOKIS, G.; TISHLER, T. A. MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease. *Cellular and Molecular Biology*, v. 46, n. 4, p. 821-833, 2000.

BASS, T. M. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing Development*, v. 128, n. 10, p. 546-52, 2007.

BATISTA, M. F.; SOUZA, A. I.; BRESANI, C. C. Anemia como problema de saúde pública: uma realidade atual. *Ciência e saúde coletiva*, v.13, n.6, p. 1917-1922, 2008.

BATISTA-NASCIMENTO, L. B. et al. Iron and Neurodegeneration: From Cellular Homeostasis to Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2012, p. 1-8, 2012.

BAUR, J. A. Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 131, p. 261-269, 2010.

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

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.

BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A. E. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, v. 120, n. 2, p. 155-159, 1979.

CASTELLANI, R. J. et al. Iron: the redoxactive center of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurochemical Research*, v. 32, p.1640-5, 2007.

---

CHOI, J.Y. Iron intake, oxidative stress-related genes MnSOD and MPO and prostate cancer risk in CARET cohort. *Carcinogenesis*, v. 29, n. 5, p. 964-70, 2008.

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

CRICHTON, R. R. et al. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 91, n. 1, p. 9-18, 2002.

DAIRAM, A. et al. Antioxidant and Iron-Binding Properties of Curcumin, Capsaicin, and S-Allylcysteine Reduce Oxidative Stress in Rat Brain Homogenate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 9, p. 3350-3356, 2008.

DANI, C. et al. Antioxidant Protection of Resveratrol and Catequin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 4268-4272, 2008.

DAL-PIZZOL, F. et al. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult wistar rat. *Developmental Brain Research*, v. 130, n. 1, p. 109-114, 2001.

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

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

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.; FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco*, v. 56, p. 497-500, 2001.

FABRIZIO, P.; LONGO, V. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, v. 2, p. 73-81, 2005.

---

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

FLEMING, J. D. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, p. 1375-1384, 2002.

FRANCESCHINI, S. C. C. et al. Prevalência e fatores determinantes da anemia em crianças assistidas em creches de Belo Horizonte – MG. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 15, n. 3, p. 675-684, 2011.

GEMS, D.; PARTRIDGE, L. Genética da longevidade em organismos-modelo: debates e mudanças de paradigma. *Annual Review of Physiology*, v.10, n. 75, p. 621-644, 2013.

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.

GILCA, M. “The oxidative hypothesis of senescence.” *Journal of Postgraduate Medicine*, v. 53, n. 3, p. 207–213, 2007.

HAIGIS, M. C.; GUARENTE, L. P. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes and Development*, v. 20, p. 2913-2921, 2006.

HAIGIS, M. C.; GUARENTE, L. P. Mammalian sirtuínas emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes and Development*, v. 20, p. 2913-2921, 2010.

HAIGIS, M. C.; SINCLAIR, D. A. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 5, p. 253-295, 2010.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 119, p. 598-620, 1992.

---

HERRANZ, D.; SERRANO, M. SIRT1: Recent lessons from mouse models. *Cancer*, v. 10, p. 819-823, 2010.

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.

IMAI, S. Aging and Bio-motor function. The Sirtuin family: Regulators that connect metabolism, aging, and longevity. *Clinical Calcium*, v. 23, n. 1, p. 29-38, 2013.

KAEBERLEIN, M. et al. *Sir2*-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *Plos Biology*, v. 2, n. 9, p. 1381-1387, 2004.

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

KAEBERLEIN, M. et al. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 17, p. 17038-17045, 2005.

KAEBERLEIN, M.; MCVEY, M.; GUARENTE, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Development*, v. 13, p. 2570-2580, 1999.

KONRAHT, G. *Spirulina platensis* como mimetizador da restrição calórica em ratos. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.

KUDO, H. et al. Effects of colloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. *Toxicology*, v. 246, n. 2, p. 143-147, 2008.

LAMMING et al. HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction. *Science*, v. 309, n. 5742, p. 1861-1864, 2005.

LAUER JUNIOR, C. M. A influência dos íons cálcio e magnésio na toxicidade do cádmio e o envolvimento da proteína Prm1 no uso da via secretora para a desintoxicação de cádmio em *Saccharomyces cerevisiae*. 2207. 99 f. Dissertação

---

(Mestrado em Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

LEADSHAM, J. E. et al. Apoptosis and the yeast actin cytoskeleton. *Cell Death & Differentiation*, v.17, p.754-762, 2010.

LIN, S. J.; DEFOSSEZ, P.A.; GUARENTE, L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, n. 289, p. 2126-2128, 2000.

LIU, Q. et al. Role of iron deficiency and overload in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications. *Currente Medicina Chemistry*, v.16, n.1, p. 113-29, 2009.

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

MESQUITA, S. D. et al. Modulation of iron metabolism in aging and in Alzheimer's disease: relevance of the choroid plexus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 6, n. 25, p. 16-25, 2012.

MICHISCHITA, E. et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*, v. 452, n. 7186, p. 492-496, 2008.

NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 13, n. 124, p. 233-888, 2011.

NNÚÑEZ, M. T. et al. Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals*, v. 25, p.761-776, 2012.

NOALE, M. 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.

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

---

PAIVA, A. C.; ALFENAS, R. C. G.; BRESSAN, J. Efeitos da alta ingestão diária de proteínas no metabolismo. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 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, p. 193-9, 2001.

POTTER, T. M.; NEUN, B. W.; STERN, S. T. Assay to detect lipid peroxidation upon exposure to nanoparticles. *Methods in Molecular Biology*, v. 697, n. 181-189, 2011.

RAMIREZ, R. L. et al. Relation of cytosolic iron excess to cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *American Journal of Cardiology*, v. 110, n. 12, p. 1820-7, 2012.

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

REVERTER-BRANCHAT, G. et al. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 31983-31989, 2004.

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

SCHNEIDER, S. A.; BHATIA, K. P. Syndromes of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Seminars in Pediatric Neurology*, v. 19, n. 2, p. 57-66, 2012.

SEBASTIANI, G.; PANTOPOULOS, K. Disorders associated with systemic or local iron overload: from pathophysiology to clinical practice. *Metallomics*, v. 3, n. 10, p. 971-986, 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.

SHEFTEL, A. D.; MASON, A. B.; PONKA, P. The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1820, p. 161-187, 2012.

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

SILVA, S. M.; BASSO, L. C. Efeitos do cádmio sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* pe-2 e *Saccharomyces cerevisiae* iz-1904, e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 16-22, 2004.

SIQUEIRA, E. M. A.; ALMEIDA, S. G.; ARRUDA, S. Papel adverso do ferro no organismo. *Comunicação Ciência e Saúde*, 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.

VAN CAMPENHOUT, A. et al. Iron-induced oxidative stress in haemodialysis patients: a pilot study on the impact of diabetes. *Biometals*, v. 21, v. 2, p. 159-170, 2008.

WOOD, J.G. et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, v. 430, n. 7000, p. 686-9, 2004.

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, 2011.

YAMAMOTO H, SCHOONJANS K, AUWERX J. Sirtuin functions in health and disease. *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, n. 8, p. 1745-55, 2007.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Buscando atender ao objetivo geral da dissertação, a pesquisa abordou os efeitos da restrição calórica e do extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2Δ*, agregando conhecimentos referentes ao tema, atendendo também, aos objetivos específicos da pesquisa.

O estudo progrediu considerando a proposta do Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Universidade de Passo Fundo sintetizando aqui os resultados obtidos em uma produção científica, na qual, os dados coletados foram sistematizados e descritos referindo os efeitos das terapias empregadas (RC e Extrato de *Spirulina platensis*) no processo de envelhecimento celular da levedura, quando submetida a um estressor como o ferro. Tal produção está anexa ao presente texto e devidamente submetida à publicação.

Na produção científica I destacam-se como resultados na análise de sobrevivência celular que a cepa *sir2Δ* apresentou uma redução no percentual de sobrevivência em comparação com a cepa controle (WT). Também se constatou um efeito benéfico das terapias na proteção dos danos celulares induzidos pelo ferro, tanto antes, quanto após o processo de envelhecimento celular (24h) para ambas as cepas estudadas. Na análise de peroxidação lídica verificou-se maior lipoperoxidação nas células de *Saccharomyces cerevisiae* deletadas ao gene *sir2Δ*, quando comparadas com a cepa controle. Entretanto, constatou-se que quando as terapias foram aplicadas as mesmas, mostraram-se capazes de atenuar os danos induzidos pelo metal, reduzindo a formação de radicais livres.

Os resultados sugerem necessidade de ampliar os estudos neste cenário do processo de envelhecimento celular visando futuramente à utilização em potencial

dessas terapias no combate aos danos causados pelo excesso de ferro, para o aumento da longevidade com qualidade de vida e preferivelmente com ausência de patologias.

## 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.

AKHTAR, R. S.; STERN, M. B. New concepts in the early and preclinical detection of Parkinson's disease: therapeutic implications. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 12, n. 12, p. 1429-1438, 2012.

ALFIERI, M.A., LEUNG, F.Y., GRACE, D.M. Selenium and zinc levels in surgical patients receiving total parenteral nutrition. *Biological Trace Element Research*, v.61, n.1, p.33-39, 1998.

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.

ALTAMURA, S; MUCKENTHALER, M. U. Iron Toxicity in Diseases of Aging: Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Atherosclerosis. *Journal of Alzheimer's Disease*, v.16, n. 4, p.879-895, 2009.

ANDREWS, S. R. et al. Yeast extract, brewer's yeast and *Spirulina* in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. *Research in Veterinary Science*, v. 91, n.1, p. 103-109, 2010.

ANTUNES-NETO, J. M. F.; SILVA, L. P.; MACEDO, D.V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. *Revista Brasileira de Ciências e Movimento*, v.13, n.2, p.7-15, 2005.

AZEREDO, C. M. et al. Implantação e impacto do Programa Nacional de Suplementação de Ferro no município de Viçosa - MG. *Ciência saúde coletiva*, v.16, n.10, p. 4011-4022, 2011.

---

BATISTA, M. F.; SOUZA, A. I. BRESANI, C. C. Anemia como problema de saúde pública: uma realidade atual. *Ciência e saúde coletiva*, v.13, n.6, p. 1917-1922, 2008.

BATISTA-NASCIMENTO, L. B. et al. Iron and Neurodegeneration: From Cellular Homeostasis to Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2012, p. 1-8, 2012.

BELAY, A. et al. Current knowledge on potential health benefits of spiruline. *Journal of Applied Physics*, v. 5, p. 235-241, 2002.

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. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 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 et Biophysical Research Communications*, v. 275, p. 20-25, 2001.

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, 1999.

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.

BORDONE, L.; GUARENTE, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 4, p. 298-305, 2005.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 344 de 15 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. ANVISA publicações

---

eletrônicas. 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em: 12 dez.2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. PNDS 2008 Relatório da pesquisa nacional de demografia e saúde da criança e da mulher. Brasília; 2008. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/pnds2006>>. Acesso em: 02 jan. 2013.

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

COLLA, L. M.; BAISH, A. L. M.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, n.2 p. 405-411, 2008.

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

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

ESQUENAZI, D. A. Imunossenescência: As Alterações do Sistema Imunológico Provocadas pelo Envelhecimento. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 7, n.1, p. 38-45, 2008.

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

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

FERREIRA, T. A. A.; RODRIGUES, H. G.; PAIVA, L; R. Efeitos do envelhecimento sobre o encéfalo. *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano*, Passo Fundo, v. 5, n. 2, p. 46-64, 2008.

---

FILIPPSEN, E. K. et al. C. Associações do estado nutricional, homocisteinemia e suplementação de folato com a disfunção cognitiva de mulheres idosas. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 23, n. 4, p. 243-249, 2008.

FLEMING, J. D. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, p. 1375-1384, 2002.

GAN, L.; MUCKE, L. Paths of convergence: Sirtuins in aging and neurodegeneration. *Neuron Cell*, v. 58, p.10-14, 2008.

GEMS, D.; PARTRIDGE, L. Genética da longevidade em organismos-modelo: debates e mudanças de paradigma. *Annual Review of Physiology*, v.10, n. 75, p. 621-644, 2013.

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.

GILCA, M. “The oxidative hypothesis of senescence.” *Journal of Postgraduate Medicine*, v. 53, n. 3, p. 207–213, 2007.

GILLUM, R. F. Association of sérum ferritin and índices of body fat distribution and obesity in Mexican American men the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *International Journal of Obesity*, v. 25, p. 639-645, 2001.

GLICKSTEIN, H. et al. Action of chelators in ironloaded cardiac cells: accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood*, v. 108, n. 9, p. 3195– 3203, 2006.

GRONEVALT, A. T. M. *Efeito da Spirulina platensis nos sintomas dispépticos de idosos após suspensão do uso crônico de inibidores da bomba protônica*. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

GUARENTE, L. Mitochondria-A Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins? *Cell*, v. 132, n. 2, p. 171- 176, 2008.

---

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 Instituto Adolfo Lutz*, v. 69, n. 1, 2010.

HAIGIS, M. C.; GUARENTE, L. P. Mammalian sirtuínas emerging roles in physiology, aging and calorie restriction. *Genes and Development*, v. 20, n. 21, p. 2913-2921, 2006.

HAIGIS; SINCLAIR, D. A. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 5, p. 253-295, 2010.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medical*, v. 119, p. 598-620, 1992.

HAZRA, B.; SARKAR, R.; MANDAL, N. Spondias pinnata stem bark extract lessens iron overloaded liver toxicity due to hemosiderosis in Swiss albino mice. *Annals of Hepatology*, v. 12, n. 1, p. 123- 129, 2013.

HENRIKSON, R. *Microalga Spirulina: superalimento del futuro*. Barcelona: Ediciones Urano S.A., 1995.

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.

JAMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, v. 10, n. 283, p. 65-87, 2011.

JIANG, R.; MANSON, J. E.; MEIGIS, J. B. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA*, v.291, p. 711-717, 2004.

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

---

KAEBERLEIN, M. The ongoing saga of sirtuins and aging. *Cell Metabolism*, v. 8, n. 1, p. 4-5, 2008.

KAZANTSEV, A. G.; OUTEIRO, T. F. Editorial on special topic: sirtuins in metabolism, aging, and disease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 3, n. 71, p.1-2, 2012.

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.

KHAN, M. et al. Protective effect of *Spirulina* against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytotherapy Research*, v. 19, n. 12, p. 1030-1037, 2005.

KOHGO, Y. et al. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *International Journal of Hematology*, v.88, n. 1, p. 7-15, 2010.

KOUBOVA, J.; GUARENTE, L. "How does calorie restriction work?" *Genes & Development*, v.17, n.3, p.313-321, 2003.

LEAL, M. F.C.; CATARINO, R. I. L.; PIMENTA, C. A. Especificação de Cobre e Zinco em Urina – Importância dos Metais em Doenças Neurodegenerativas. *Química Nova*, v. 35, n. 10, p. 1985-1990, 2012.

LI, W. et al. Overexpression of transferrin receptor and ferritin related to clinical symptoms and destabilization of human carotid plaques. *Experimental Biology and Medicine*, v. 233, p. 818-826, 2008.

LIN, S. J. et al. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*, n. 418, p. 344–348, 2002.

LIN, S. J.; DEFOSSEZ, P.A.; GUARENTE, L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, n. 289, p. 2126-2128, 2000.

---

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.

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

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.

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.

MCCARTY, M. F.; BARROSO-ARANDA, J.; CONTRERAS, F. "The low-methionine content of vegan diets may make methionine restriction feasible as a life extension strategy." *Medical Hypotheses*, v. 72, n. 2, p. 125–128, 2010.

MCCAY, C. M., CROWELL, M.F., AND MAYNARD, L.A. The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. *The Journal of Nutrition*, v.10, p. 63–79, 1935.

MENDES, J. F. et al. Iron status and axidative stress biomarkers iin adults: a preliminar study. *Nutrition*, v. 25, n.4, p. 379-384, 2009.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. sirtuins in mammals: insights into their biological. *Biochemical Journal*, v, 404, n. 1, p. 1-13, 2007.

MILLER-FLEMING, L.; GIORGINI, F.; OUTEIRO, T. F. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnology Journal*, v. 3, n. 3, p. 325-338, 2008.

MILNE, J. C.; DENU, J. M. The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 12, n. 1, p. 11-17, 2008.

---

NNÚÑEZ, M. T. et al. Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals*, v.25, p.761-776, 2012.

NOALE, M. 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.

OLIVEIRA, M. R. *Ação do benzofibrato um agonista de PPAR- $\alpha$  sobre a hipercolesterolemia induzida por dieta e excesso de ferro em hamsteres*. 2007. 97 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). *The world health report*. Geneva, 2005.

OSHIRO, S.; MORIOKA, S. M. KIKUCHI, M. Dysregulation of Iron Metabolism in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Advances in Pharmacological Sciences*, v. 2011, p. 1-8, 2011.

OUTEIRO, T. et al. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1782, n.6, p. 363-369, 2008.

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

PIPER, P. W. Long-lived yeast as a model for ageing research. *Yeast*, v. 23, n.3, p. 215–226, 2006.

PIPERNO, A. et al., Increased serum ferritin is common in men with essential hypertension. *Journal of Hypertension*, v. 20, n. 8, p.1513-1518, 2002.

POLJSAK, B. et al. Reproductive Benefit of Oxidative Medicine and Cellular Longevity “Malevolena”? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.1, p.2-9, 2011.

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 Farmacologia*, v.17, n.4, p. 631-639, 2007.

ROE, D.A. Effects of drugs on vitamins needs. *Annals of the New York Academy Sciences*, New York, v.669, p.156-163, 1992.

ROSAS, D. H. et al. Alterations in Brain Transition Metals in Huntington Disease An Evolving and Intricate Story. *Archives of Neurology*, v. 69, n. 7, p. 887-93, 2012.

SANTOLIN, M. B. *Retardo do envelhecimento cronológico pela restrição calórica e a ficocianina em células de Saccharomyces cerevisiae mutantes ao gene sir*. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

SCHRODER, N. et al. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behavioural Brain Research*, v. 124, p. 77-85, 2011.

SCHRÖDER, N.; FIGUEIREDO, L. S.; LIMA, M. N. Role of Brain Iron Accumulation in Cognitive Dysfunction: Evidence from Animal Models and Human Studies. *Journal of Alzheimer's Disease*, v.34, n. 4, p. 23- 36, 2012.

SCHULZ, T. J. et al. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metabolism*, v. 6, n. 4, p. 280–293, 2007.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr./jun., 2004.

SHEFTEL, A. D.; MASON, A. B.; PONKA, P. The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1820, p. 161–187, 2012.

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

---

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, 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 organism. *Comunicação Ciência e Saúde*, 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.

SRIPETCHWANDEE, J. et al. Mitochondrial calcium uniporter blocker effectively prevents brain mitochondrial dysfunction caused by iron overload. *Life Sciences*, v. 92, n. 13, p. 4-7.

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.12, p.11-17, 2012.

THAAKUR, S.; SRAVANTHI, R. Neuroprotective effect of *Spirulina* in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Neural Transmission*, v. 117, n. 9, p. 1083-1091, 2010.

TONIOLLO, C. L. *Ficocianina na terapêutica de lesões cutâneas induzidas em ratos envelhecidos*. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

VAUPEL, J.W. Biodemography of human ageing. *Nature*, v. 464, p. 536-42, 2010.

VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de Frutos Tropicais. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.

VIEIRA, R. C. S.; FERREIRA, H. S. Prevalência de anemia em crianças brasileiras, segundo diferentes cenários epidemiológicos. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 3, p. 433-444, 2010.

---

WANG, Z. et al. Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone-transgenic and calorie-restricted mice. *Endocrinology*, v. 148, n. 6, p. 2845-2853, 2007.

WESTPHAL, C. et al. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends in Biochemical Sciences*, v.32, n.12, p.555-560, 2007.

YAMAMOTO, H. et al. Sirtuin functions in health and disease. *Molecular Endocrinology*, v. 21, n. 8, p.1745-1755. 2007.

YOUDIM, M. B. H.; BEM-SHACHAR, D. B.; RIEDERER, P. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 80, n. 126, p. 47-54, 2009.

YUAN, Y. et al. Enhanced Energy Metabolism Contributes to the Extended Life Span of Calorie-restricted *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 37, p. 31414-31426, 2012.

ZATTA, P. et al. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 30, n. 7, p. 346-355, 2009.

ZENG, C. et al. Gender-specific prandial response to dietary restriction and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)*, v. 5, n. 3, p. 174-180, 2011.

## ANEXOS

Anexo A. Comprovante de submissão

Conectado: fabiab

Meus Dados

Desconectar

Página do Autor  
Nova Submissão  
Gerador PDF

### [tmp\_11331] - Detalhes do Manuscrito

#### Detalhes do Manuscrito

Número: **tmp\_11331**  
Título: **RESTRIÇÃO CALÓRICA E EXTRATO DE Spirulina platensis FRENTE AO ÍON FERROSO (Fe<sup>2+</sup>) NO ENVELHECIMENTO DE CÉLULAS DE Saccharomyces cerevisiae DELETADAS AO GENE SIR2Δ**

Status: Em Avaliação  
Tipo: Artigo Original  
Palavras-Chave: antioxidantes; iron; Saccharomyces cerevisiae.

Carta: O envelhecimento é acompanhado por mudanças na atividade de células, tecidos e órgãos. O acúmulo progressivo destas alterações tem sido associado ao desequilíbrio do organismo em relação a determinados metais, com ênfase ao ferro. Terapias antioxidantes podem interferir neste processo, reduzindo danos causados pelo ferro. A *Spirulina platensis* apresenta propriedades como antioxidante, verificada em modelos in vivo e in vitro. A restrição calórica (RC) tem sido relatada por reduzir a incidência de patologias e prolongar o tempo de vida em diversos modelos experimentais. Seus benefícios podem estar relacionados com a ativação do gene sir2. Neste contexto, objetivou-se determinar os efeitos do extrato de *Spirulina platensis* e da RC frente ao íon ferroso no envelhecimento da *Saccharomyces cerevisiae* deletadas ao gene sir2Δ. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* WT e sir2Δ crescidas em meio YPD 2 % glicose e YPD 0,5 % glicose (RC) foram expostas ou não a 0,8 mg/mL de extrato de *Spirulina platensis* e a 1mM de Fe<sup>2+</sup>. Após procederem-se análises de viabilidade celular e lipoperoxidação. Os resultados mostraram redução de sobrevivência celular na ausência de sir2Δ. Verificou-se resultados significativos antes do envelhecimento para os tratamentos Padrão, RC, RC+Fe<sup>2+</sup> e após o envelhecimento para os tratamentos Padrão, Extrato de *Spirulina platensis*, RC, Extrato de *Spirulina platensis* + Fe<sup>2+</sup>, RC+Fe<sup>2+</sup>. A lipoperoxidação foi aumentada na ausência de sir2Δ, tanto antes quanto após o envelhecimento para todos os tratamentos. A deleção de sir2Δ diminuiu a sobrevivência celular e aumentou a lipoperoxidação. As terapias utilizadas mostraram efeito protetor frente ao íon ferroso.

Arquivo PDF: [tmp\\_qn\\_11331.pdf](#)

#### Autor 1

Nome: Fábيا  
Nome do Meio(Iniciais):  
Sobrenome: Benetti

#### Autor 2

Nome: Tiago  
Nome do Meio(Iniciais): Fleming  
Sobrenome: Outeiro

#### Autor 3

Nome: Telma  
Nome do Meio(Iniciais): Elita  
Sobrenome: Bertolin

## APÊNDICES

## Apêndice A. Curvas de Crescimento

## Curvas de Crescimento

O metabolismo fermentativo pode ser diferenciado do respiratório através da taxa de crescimento de cada cepa em determinado meio de cultura. Para verificar em que fase metabólica cada cepa se encontrava, elas foram inoculadas em dois meios diferentes: YPD 2% e YPD 0,5%. O meio YPD 2% é considerado rico em glicose, o que leva as células de levedura crescidas nele a uma repressão catabólica superior. Já o meio YPD 0,5%, até aqui caracterizado como meio de restrição calórica, por possuir menos glicose apresenta uma repressão catabólica menor, dando às células crescidas nele opção quanto ao tipo de metabolismo adotado.

Tabela 1- Tempo de geração da célula (Tg) e Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) em meio YPD 0,5 %.

<b>Cepa</b>	<b>Tg</b>	<b><math>\mu</math></b>
Controle	2,19	0,3158
Sir 2	2,25	0,3079

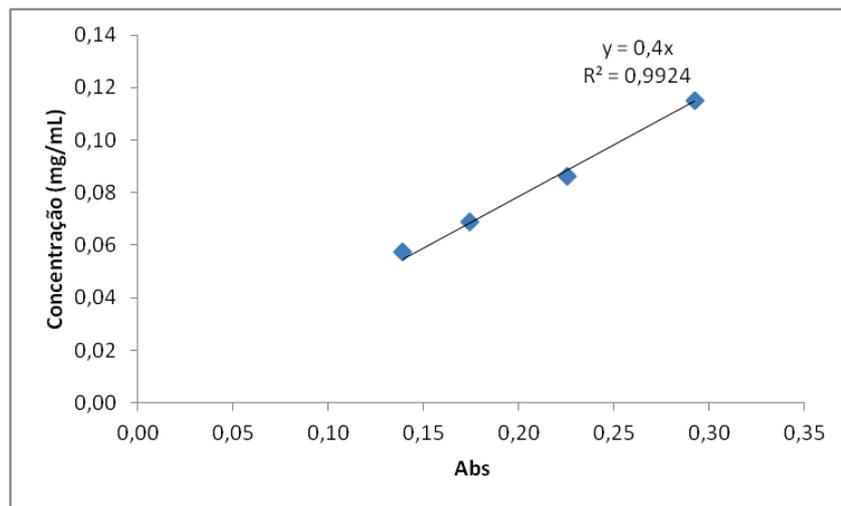
As Tabelas 1e 2 apresentam os resultados do tempo de geração e da velocidade específica de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtidos através das curvas de crescimento das diferentes cepas controle e deletadas ao gene *sir2 $\Delta$*  conforme nos tratamentos padrão (2% de glicose) e restrição calórica (0,5% de glicose). Com a construção desta curva, foi possível determinar o tempo necessário para que a cultura utilizada nos experimentos atinja a fase log ou exponencial. Nesta fase a cultura se apresentava em plena multiplicação e atividade.

Tabela 2- Tempo de geração da célula (Tg) e Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) em meio YPD 2 %.

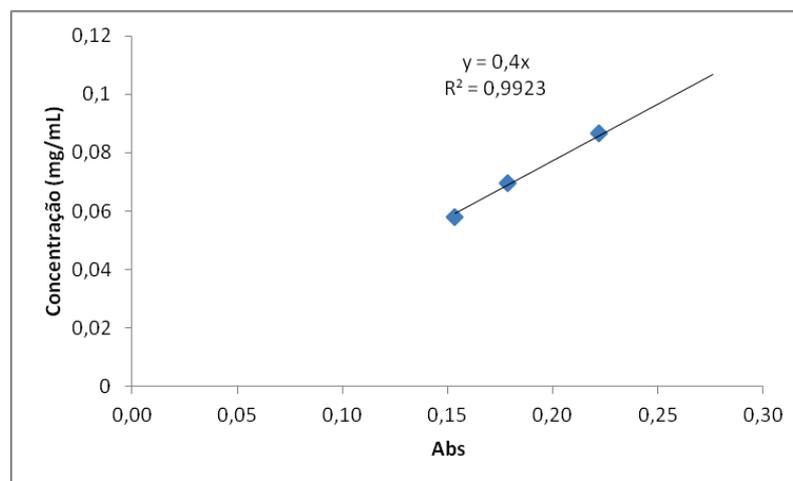
<b>Cepa</b>	<b>Tg</b>	<b><math>\mu</math></b>
Controle	1,84	0,3753
Sir 2	1,90	0,3641

De acordo com Silva (2007), para atingir a fase log, a cultura deve apresentar a concentração entre 0,5 mg/mL a 1,0 mg/mL. As cepas quando crescidas nos meios YPD 2% e YPD 0,5% apresentaram uma taxa de crescimento no meio YPD 0,5% maior do que no meio YPD 2%, característica de um metabolismo parcialmente respiratório. Porém, no meio YPD 0,5%, a cepas apresentaram um crescimento mais rápido do que nas cepas com YPD 2%, indicando que nesta situação a redução da concentração de glicose faz com que as células favorecerem a respiração mesmo sob baixa repressão catabólica.

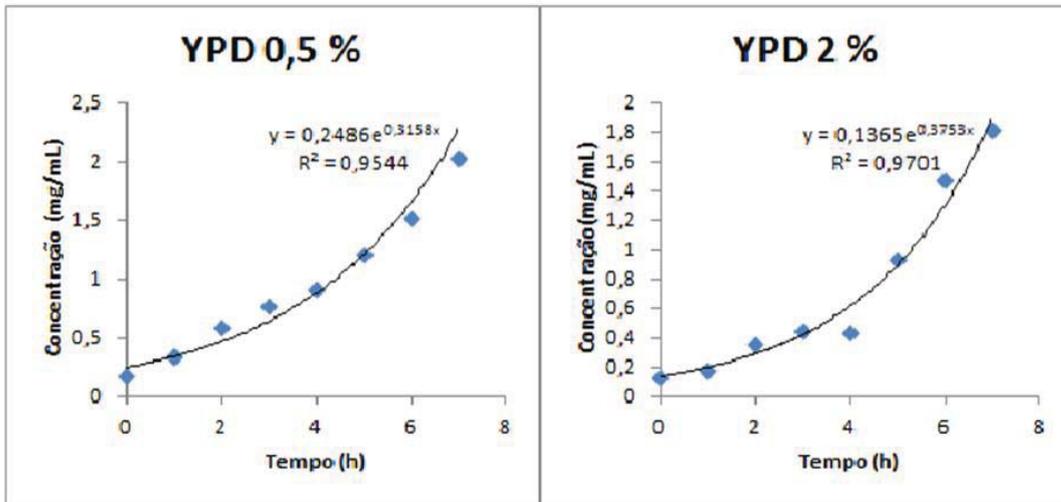
Curva de peso seco controle



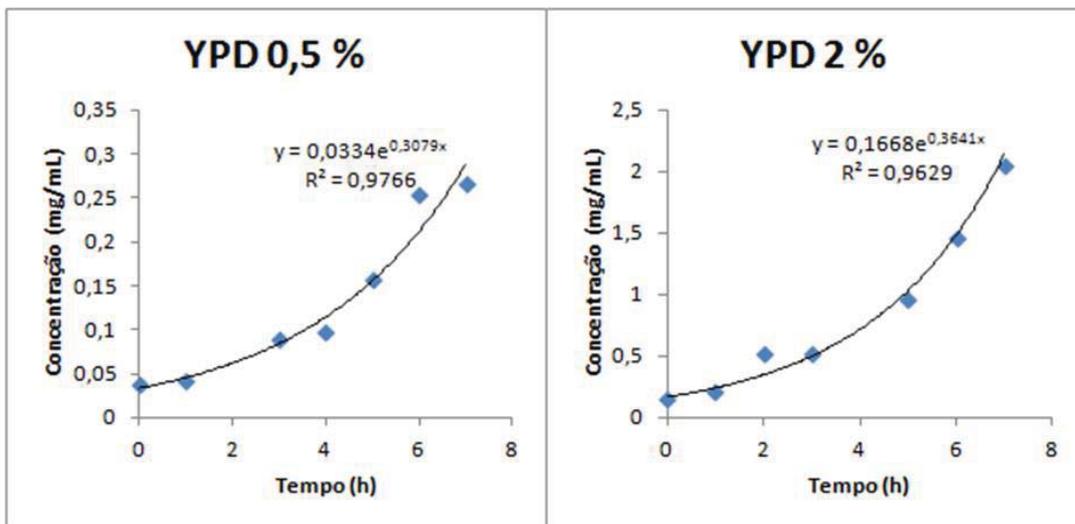
Curva de peso seco Sir 2



Curva de Crescimento Celular da cepa Controle



Curva de Crescimento Celular da cepa Sir 2



Curva Padrão 1, 1, 3, 3, tetrametoxipropano

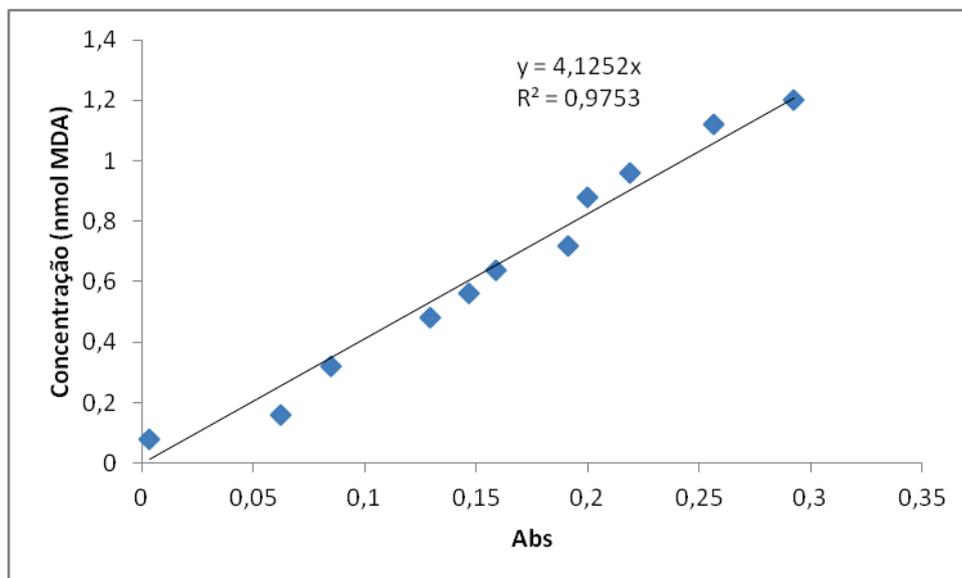


Tabela de ANOVA aplicado ao teste de citotoxicidade do extrato de *Spirulina platensis*

	Variável	SQ	GL	MQ	F	P
<b>Cepa</b>	Entre Grupos	1452,491	2	726,245	6,714	0,029
	Dentro dos grupos	649,036	6	108,173		
<b>Controle</b>						
	Total	2101,526	8			

\* Resultados de Anova com nível de significância de ( $p < 0,05$ ).

Tabela de ANOVA aplicado ao teste de citotoxicidade do  $Fe^{2+}$

	Variável	SQ	GL	MQ	F	P
<b>Cepa</b>	Entre Grupos	11412,598	2	5706,299	271,016	,000
	Dentro dos grupos	505,325	24	21,055		
<b>Controle</b>						
	Total	11917,923	26			

\* Resultados de Anova com nível de significância de ( $p < 0,05$ ).

## Apêndice B. 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 Fe<sup>2+</sup> no  
envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*

Fábia Benetti

Passo Fundo

2012

## 1 DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

### 1.1 TÍTULO

Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao  $Fe^{2+}$  no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 1.2 AUTORA

Fábia Benetti – Graduada em Nutrição pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim (2009); Mestranda Bolsista do Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Universidade de Passo Fundo; e-mail: fabia\_b.14@hotmail.com.

### 1.3 ORIENTADORA

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 Universidade de Passo Fundo; e-mail: telma@upf.br..

### 1.4 CO-ORIENTADOR

Tiago Fleming Outeiro, professor da Universidade de Lisboa; Doutor em Ciências Biomédicas pelo Massachusetts Institute of Technology (EUA) e Universidade do Porto (Portugal); Pós-doutor em Bioquímica com ênfase em Neurociência Molecular pela Harvard Medical School (2007); e-mail: touteiro@gmail.com.

### 1.5 DURAÇÃO

O mestrado terá duração de 24 meses, sendo que o período para o trabalho experimental está previsto para 8 meses.

## 1.6 VIGÊNCIA

A pesquisa iniciará no mês de março de 2012 e estender-se-á até outubro de 2012.

## 1.7 RESUMO

O processo de envelhecimento está associado não somente as alterações na atividade de células, tecidos e órgãos, como também, com a redução da eficácia de um conjunto de sistemas fisiológicos. O acúmulo progressivo destas alterações é associado com a crescente suscetibilidade a patologias que acompanham o avançar da idade. Danos oxidativo em biomoléculas, e o aumento de acumulação de ferro em áreas do cérebro têm sido evidenciados como possíveis causas de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, e a doença de Alzheimer. Segundo esta evidência terapias antioxidantes podem interferir neste processo, reduzindo o estresse oxidativo e os danos causados pelo acúmulo de ferro. A utilização de terapias antioxidantes vem recebendo destaque na atualidade, visto que estudos sugerem uma relação inversa entre o uso destas e a incidência de inúmeras doenças. A microalga *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 tem sido identificada como uma terapia antioxidante, e também com efeitos determinantes na longevidade mediada pela indução do gene Silent Information Regulator 2 (*sir2*). Neste contexto, objetiva-se avaliar o potencial antioxidante do extrato de *Spirulina platensis* e RC em células de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ao estressor  $Fe^{2+}$ . As células de levedura serão analisadas quanto à viabilidade celular via técnica de plaqueamento e danos oxidativos pela oxidação de lipídeos.

## 1.8 PALAVRAS-CHAVE

Envelhecimento. Antioxidantes. Radicais Livres. Ferro. Levedura. Sirtuínas.

## 2 FINALIDADE

Contribuição à construção do conhecimento, referente à Ciência do Envelhecimento, com o desenvolvimento de uma Dissertação de Mestrado visando à obtenção do título de mestre em Envelhecimento Humano, bem como a produção de textos para a publicação em periódicos da área.

## 3 PROBLEMÁTICA E QUESTÃO DE PESQUISA

O processo do envelhecimento predispõe uma série de eventos fisiológicos, dentre eles, o estresse oxidativo. Este processo está relacionado a um grande número de doenças como as neurodegenerativas, aterosclerose, câncer, doenças auto-imunes e inflamatórias.

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, o ferro torna-se letal, estando associado com o desenvolvimento de patologias e envelhecimento precoce. Estudos da atualidade sugerem uma forte ligação entre o excesso de ferro em áreas do cérebro e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, destacando-se a doença de Parkinson e Alzheimer.

Recentes investigações científicas mostram a utilização da terapia de restrição calórica e de antioxidantes naturais, que favorecem o equilíbrio homeostático, na defesa e sobrevivência celular, em resposta aos eventos do envelhecimento em inúmeros modelos experimentais como roedores, leveduras, *Drosophila*, entre outros. Estudos anteriores afirmavam que proteínas *sir2* podem através da RC regular a longevidade, aumentando níveis de NAD<sup>+</sup> disponível. Sendo que a superexpressão do gene resulta em prolongamento da vida enquanto a supressão da *sir2* diminui o tempo de vida útil, entretanto existem atualmente publicações atuais que indicam que o prolongamento da vida via RC não dependem da presença de *sir 2*.

Neste contexto, pergunta-se: a utilização do extrato de *Spirulina platensis* e da restrição calórica poderão aumentar a longevidade e inibir os danos oxidativo induzidos pelo estressor  $Fe^{2+}$  em células de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2Δ*?

#### 4 JUSTIFICATIVA

Após levantamento bibliográfico, verificou-se a inexistência de trabalhos que relacionam a utilização da terapia de restrição calórica associada ao extrato de *Spirulina platensis* com a finalidade de proporcionar aumento da longevidade e redução dos danos oxidativo no modelo experimental *Saccharomyces cerevisiae* quando submetido ao estressor  $Fe^{2+}$ . O interesse pela realização deste trabalho surgiu devido à importância do assunto na elucidação de eventos biológicos do processo de envelhecimento. Existem várias abordagens capazes de aumentar a longevidade celular, porém os mecanismos envolvidos com o processo de envelhecimento ainda não estão bem estabelecidos.

Como vem sendo reportado na literatura, evidências indicam que espécies reativas de oxigênio geradas por metais pesados possam ter um papel importante na etiologia de doenças. O ferro em excesso no organismo mostra-se prejudicial associado ao desenvolvimento de desordens neurodegenerativas (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006, BRAR et al., 2009).

Pesquisas destacam a existência de substâncias e comportamentos que podem ter efeitos benéficos sobre a longevidade. Estes estudos sugerem que os benefícios antienvhecimento ou relativo à proteção a 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).

Os danos celulares podem ser provocados por espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio. Resultam também do ataque a macromoléculas que escapam à sua neutralização, ou quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes onde os primeiros sejam predominantes (VASCONCELOS et al., 2007).

Estes efeitos têm sido associados ao envelhecimento e desenvolvimento de patologias (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

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:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ROS) +  $\text{Fe}^{2+}$  =  $\text{Fe}^{3+}$  OH (RL) + OH $\cdot$ . Desta forma o ferro por aumentar a produção de RL, pode levar a 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).

O ferro é essencial para o metabolismo neuronal normal, incluindo sua participação na geração de energia mitocondrial e mielinização. No entanto, os níveis excessivos de ferro cerebral podem levar ao estresse oxidativo e assim 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 Parkinson e Alzheimer (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, DNA) que são afetadas neste processo (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008).

Estudos evidenciam os efeitos terapêuticos da microalga *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 microalga, se extrai a ficobiliproteína ficocianina, que apresenta capacidade antioxidante, atuando no aumento da imunidade, induzindo a apoptose em células cancerígenas, como na leucemia (LU; YU, LI, 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 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. Entretanto, outras intervenções foram propostas com a realização de estudos com leveduras, onde descobriu-se que o efeito determinante da longevidade poderia ser mediado pela indução de um gene chamado silent information regulator 2 (*Sir2*) que codifica uma enzima, a histona desacetilase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) (ALMEIDA, 2007; FONTAN; PARTRIDGE; LONGO, 2010; EVANS et al., 2010).

Uma das maiores dificuldades no estudo do envelhecimento em humanos é a sua longa duração, por isso, muitas vezes torna-se difícil estudá-lo in vivo e também por questões éticas muitas pesquisas não podem ser realizadas com seres humanos. A fim de saber mais sobre a biologia do envelhecimento, é fundamental ter modelos adequados para este estudo (KAEBERLEIN, 2010).

Neste contexto a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada um dos modelos de sistema eucariótico unicelular mais importante para estudos relacionados ao envelhecimento, sob o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos mais utilizados em testes biológicos (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005; KAEBERLEIN, 2010, YUCEL; ULGE, 2011).

Embora o grande interesse e as muitas iniciativas existentes cooperem na busca de terapias antienvhecimento, faz-se necessário ampliar as informações a cerca do uso da restrição calórica e de substâncias com atividade funcional antioxidante, quando expostos a um estressor como o excesso de ferro. Neste contexto, objetiva-se avaliar a

capacidade antioxidante do extrato de *Spirulina platensis*, e da RC frente aos danos causados pelo  $\text{Fe}^{2+}$ , na longevidade de *Saccharomyces cerevisiae*.

## 5 OBJETIVO DA PESQUISA

### 5.1 OBJETIVO GERAL

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

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar se o  $\text{Fe}^{2+}$  atua como estressor no modelo *Saccharomyces cerevisiae*, cepas controle e deletada ao gene *sir2Δ*.
- b) Avaliar a sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao  $\text{Fe}^{2+}$  nas cepas controle e deletada ao gene *sir2Δ*, antes e após o envelhecimento.
- c) Verificar o efeito protetor da restrição calórica e do extrato de *Spirulina platensis* frente ao  $\text{Fe}^{2+}$  na peroxidação lipídica de *Saccharomyces cerevisiae* nas cepas controle e deletada ao gene *sir2Δ*, antes e após o envelhecimento.

## 6 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA / REVISÃO DA LITERATURA

### 6.1 ENVELHECIMENTO

O fenômeno do envelhecimento manifesta-se de forma variável ao longo da vida, entre indivíduos da mesma espécie e entre espécies distintas. Trata-se de um declínio progressivo na vitalidade ao longo do tempo, levando à morte (MOTA; FIGUEIREDO; DUARTE, 2004; DONMEZ; GUARENTE, 2010). A entrada na velhice depende de vários aspectos que ultrapassam limiares da mera cronologia, cada indivíduo reage de uma forma única ao avançar da idade (FARINATTI, 2002).

O envelhecimento populacional é atualmente um acontecimento de amplitude global, significando um crescimento mais elevado da população idosa em relação aos outros grupos etários. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2025 (OMS, 2005), existirão dois bilhões de pessoas com mais de 60 anos, sendo que os muitos idosos com 80 ou mais anos constituem o grupo etário de maior crescimento (RIVALDO et al., 2008).

Na América Latina, diversos países passam por um processo acelerado de envelhecimento de sua população, devido à redução das taxas de mortalidade e, principalmente, das taxas de fecundidade, processo já evidenciado nos países da Europa e em países desenvolvidos há algumas décadas (DE LIMA; RECH; PETROSKI, 2008).

O Brasil, antes referido como um país de jovens, também vem fazendo sua transição demográfica e passa por um rápido processo de envelhecimento populacional, fato atribuído ao aumento da expectativa de vida e redução da natalidade. Prevê-se que em 2020, haverá 1,2 bilhões de idosos no mundo, 34 milhões de brasileiros estarão acima de 60 anos, fato que colocará o país na sexta posição entre as nações mais envelhecidas do mundo (OMS, 2005; FILIPPSEN et al., 2008).

A cada ano, 650 mil novos idosos são incorporados à população brasileira, a maior parte com doenças crônicas e alguns com limitações funcionais. Em menos de 40 anos, o Brasil passou de um cenário de mortalidade próprio de uma população jovem para um quadro de enfermidades complexas e onerosas, típica dos países longevos, caracterizado por doenças crônicas e múltiplas que perduram por anos, com exigência de cuidados constantes, medicação contínua e exames periódicos (VERAS, 2009).

O envelhecimento populacional, percebido como fenômeno demográfico ocorrido no mundo inteiro, tem respaldado a elaboração de um número considerável de trabalhos científicos sobre o tema. As preocupações com o fenômeno do envelhecimento compõem a pauta diária de profissionais de especialidades biológicas, psicológicas e sociológicas (MELO; DI NUCCI; DOMINGUES, 2007).

O envelhecimento, como processo biológico do ser humano, está associado a mudanças na atividade das células, tecidos e órgãos, como também com a redução da eficácia de um conjunto de sistemas fisiológicos. Esta perda funcional é progressiva, sendo fator de morbidade e fragilidade física ou mental, tornando o indivíduo idoso mais suscetível a doenças crônicas. É um fenômeno biopsicossocial que atinge o homem e sua existência na sociedade, manifestando-se em todos os domínios da vida (ALMEIDA, 2007; FILIPPSSEN et al., 2008; REBELATTO et al., 2008).

Além das alterações biológicas normais do envelhecimento, a senescência está associada ao aparecimento de doenças infecciosas, crônicas, neurodegenerativas e cardiovasculares. O desenvolvimento de tais patologias tem sido associado ao declínio do funcionamento fisiológico, podendo levar a uma diminuição na reprodução e um aumento na mortalidade com a idade (BONSALL, 2006; NOVAES et al., 2005; MOTA et al., 2009).

O processo de envelhecimento aumenta a susceptibilidade a uma variedade de doenças, como diabetes, doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e inflamação. Os mecanismos moleculares que ligam o envelhecimento com o maior desenvolvimento de doenças relacionadas à idade, em geral, não são totalmente compreendidos (DONMEZ; GUARENTE, 2010).

Segundo Outeiro et al. (2007) o envelhecimento é um importante fator de risco para o desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas. Embora a base molecular do mesmo precise ainda ser desvendada, caminhos biológicos envolvidos no envelhecimento podem fornecer alvos para intervenções terapêuticas nas neurodegenerações.

Dentre as teorias gerais do envelhecimento, o que se verifica é que as assertivas e hipóteses envolvem a influência do processo oxidativo no envelhecimento celular (REBELATTO et al., 2008). Este processo foi descrito por Harman, em 1956, que propunha que o envelhecimento estava associado com moléculas produzidas pelo metabolismo oxidativo, denominadas radicais livres. Este autor considera que o fenômeno de envelhecimento é o resultado da acumulação de lesões moleculares

provocadas pelas reações dos radicais livres nos componentes celulares ao longo da vida, que conduzem à perda de funcionalidade e à doença com o aumento da idade, conduzindo à morte (MOTA; FIGUEIREDO; DUARTE, 2004).

## 6.2 RADICAIS LIVRES

A teoria dos radicais livres foi primeiramente proposta por Denham Harman a mais de 50 anos atrás (HARMAN, 1956). A base desta proposta é que os declínios bioquímicos e fisiológicos associados ao envelhecimento são causados por um acúmulo de danos oxidativos às células, como resultado da formação dos radicais livres, durante o metabolismo celular. O princípio subjacente a esta teoria é que haja um desequilíbrio entre a produção celular de radicais livres e a os mecanismos de defesa antioxidantes, e esse desequilíbrio é a força motriz por trás do processo de envelhecimento (SHI et al., 2010).

Radicais livres (RL) são átomos, grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não-pareados em sua camada orbital externa, o que explica sua instabilidade e elevada reatividade. A condição de ímpar pode originar-se pela perda ou ganho de um único elétron (CAVALCANTE; BRUIN, 2009, POLJSK et al., 2011). Uma vez formados estes buscam estabilizarem-se, cedendo ou doando um elétron de espécies químicas vizinhas. Estas por sua vez passam a ser RL e se estabilizam, tomando ou cedendo elétrons de outras substâncias. Desta forma, origina-se uma reação em cadeia, que termina por alterar a conformação, a estrutura ou as funções de proteínas, fosfolipídios de membrana, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (LEADSHAM et al., 2010).

Os RL são formados pela respiração celular. De todo o oxigênio utilizado pelas células na respiração, cerca de 2% a 5% dos átomos ficarão parcialmente reduzidos por aceitar um só elétron. Os principais radicais livres são os derivados do oxigênio e nitrogênio (LEHNINGER; COX; NELSON, 2002, BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As espécies reativas de oxigênio são encontradas em todos os sistemas biológicos e têm origem no metabolismo do oxigênio molecular ( $O_2$ ). Em algumas condições fisiológicas, o  $O_2$  sofre redução com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (Figura 1). Durante esse processo, são formados intermediários reativos, tais como, os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (LEHNINGER; COX; NELSON, 2002). Dentre as espécies reativas de nitrogênio incluem-se o óxido nítrico, ( $NO^{\cdot}$ ), óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) e peroxinitritos ( $ONOO^-$ ). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Sob condições fisiológicas, o vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é a maior fonte intracelular de EROS, no entanto existe muita controvérsia em relação à quantidade exata de EROS produzida nos diferentes pontos da cadeia respiratória (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A presença destas moléculas no meio intracelular produz reações de oxidação indesejáveis, que podem levar em muitos casos a lesões irreparáveis nos constituintes celulares (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos), ocasionando frequentemente a perda da viabilidade celular. Apesar da diversidade com que estas espécies reativas podem ser produzidas, as células estão frequentemente sendo expostas a condições ambientais (fontes exógenas) que as expõem, direta ou indiretamente, a altas concentrações destas moléculas como é o caso da radiação solar, agentes químicos e metais pesados (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1997).



Fonte: (AUGUSTO, 2006)

Figura 1- Reação de formação de espécies reativas de oxigênio

A produção de RL é parte integrante do metabolismo e está presente em condições normais, nos processos fisiológicos envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias importantes, tais como hormônios e enzimas. Para contrabalançar essa produção e seus potenciais efeitos negativos, o organismo dispõe de um sistema antioxidante (RAJENDRASOZHAN et al., 2008).

A formação de radicais livres nem sempre é prejudicial ao organismo, pelo contrário é necessária em vários processos biológicos, como sinalização celular, contração muscular e sistema imune. Por exemplo, quando as células são agredidas por algum agente estressor que também pode ser RL, elas acabam produzindo RL para combater esses agentes. O grande problema é que quando os níveis totais gerados de RL forem maiores que a capacidade de defesa, poderá ocorrer danos celulares significativos (PINHO, 2010).

Nos seres vivos, a produção de RL é controlada por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena ou serem provenientes da dieta alimentar. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (SOUSA et al., 2007).

A formação de radicais livres in vivo ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (radiação, fumo, má alimentação, medicamentos). Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos RL tem sido chamado de estresse oxidativo (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

### 6.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O estudo do estresse oxidativo tornou-se alvo de grande interesse para inúmeros centros de pesquisa uma vez que os agentes causadores deste processo, EROS, se mostram associados a vários processos degenerativos, como doença de Alzheimer, síndromes de Down e Parkinson, na formação e propagação de câncer e aterosclerose (BARBOSA, 2010).

O efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, estado fisiológico e dieta. Hábitos de vida inadequados, como o tabagismo, ingestão de álcool, dieta desequilibrada, exposição a radiações ionizantes, poluição, estado psicológico que provoca estresse emocional, exercício extenuante são fatores que provocam o estresse oxidativo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O desenvolvimento de estresse oxidativo tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades como a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer. A geração de radicais livres desencadeia eventos patológicos que, por sua vez, estão envolvidos nos processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos (BARBOSA, 2010).

A contínua ameaça de dano oxidativo às células ou tecidos do organismo como um todo, pode ser atenuada pela existência de uma expressiva gama de defesas celulares, que evoluíram para enfrentar as espécies oxidantes. No entanto, essas defesas não são perfeitas e, conseqüentemente, macromoléculas celulares sofrem dano oxidativo. Sugere-se que o acúmulo destas macromoléculas danificadas pode contribuir significativamente para o envelhecimento (HARMAN, 1981; SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994, OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

#### 6.4 FERRO COMO ESTRESSOR

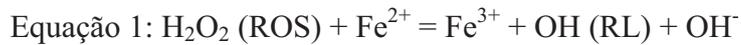
O ferro é essencial à vida devido a sua capacidade em transferir e receber elétrons, participando como catalisador das reações redox que ocorrem nas células. É um nutriente essencial para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência em longo prazo, da maioria dos organismos (FERNANDEZ et al., 2007).

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 (EROS). Um aumento na formação de EROS induzida por ferro pode ocasionar alterações funcionais e danos às membranas celulares (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008).

Devido à alta reatividade, o ferro torna-se potencialmente tóxico, uma vez que catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio, transferindo um elétron para o oxigênio molecular ( $O_2$ ), produzindo o superóxido ( $O_2^-$ ), que é o 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 promovendo 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  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , no entanto, se a concentração intracelular de superóxido é elevada, a reação favorece a redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  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 assim diminuem a formação de hidróxido de oxigênio (OH) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2006).

O ferro tem sido descrito como um elemento importante na patogênese dos mecanismos da neurodegeneração. O entendimento do seu metabolismo e das disfunções relacionadas ao estresse oxidativo é fundamental para desvendar a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como na doença de Parkinson e Alzheimer, cada vez mais prevalentes no nosso meio devido ao aumento da expectativa de vida (FERNADNEZ et al., 2007).

De todos os órgãos, o cérebro deve ser considerado o mais sensível ao estresse oxidativo devido características específicas como: alto consumo de oxigênio (20% de todo organismo); altos níveis de ferro e ascorbato (cruciais para peroxidação lipídica da membrana, através da Reação de Fenton); baixos níveis de agentes protetores antioxidantes; tendência a acumular metais; altas concentrações de neurotransmissores auto-oxidáveis que reagem com  $\text{O}_2$  produzindo espécies reativas de oxigênio; presença de aminoácidos citotóxicos; presença de enzimas que produzem  $\text{H}_2\text{O}_2$  como produtos finais de suas atividades; alto tráfego de  $\text{Ca}^{+2}$  através da membrana neuronal, seguindo interferência com transporte de íons, pela ruptura de metabolismo energético (FERNANDEZ et al., 2007).

Segundo Bermejo; Pinero; Villar (2008) danos oxidativos em biomoléculas e o aumento de acumulação de ferro em áreas do cérebro torna-se o principal aspecto

patológico de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson e de Alzheimer. Segundo esta evidência, terapias neuroprotetivas visam interferir no processo de estresse oxidativo e uma atenção especial é dada ao estudo de ações neuroprotetivas de antioxidante e quelantes de ferro. A neuroproteção em doenças neurodegenerativas pode requerer uma droga, combinando quelantes de ferro com capacidade antioxidante.

O estresse oxidativo resultante dos níveis aumentados de ferro no organismo tem sido implicado na morte celular neuronal na doença 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 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.

Estudos sobre a etiologia de doenças neurodegenerativas indicam que o excesso de ferro provoca estresse oxidativo esgotando as defesas antioxidantes no cérebro. De fato, vários agentes quelantes de ferro exibem ação neuroprotetora em modelos animais. Portanto, para uma proteção eficaz contra as doenças neurodegenerativas, a associação entre antioxidantes e ações quelantes de ferro podem ser necessárias (FIGUEREDO et al., 2011).

Estudos realizados utilizando algas indicam que elas podem ser úteis no tratamento de doenças neurodegenerativas, por ter função antioxidante, como quelante de ferro, combatendo espécies reativas de oxigênio (BERMEJO; PINERO; VILLAR, 2008).

## 6.5 LIPOPEROXIDAÇÃO

Um dos principais mecanismos de lesão causada pelo estresse oxidativo é a oxidação da camada lipídica da membrana celular, a lipoperoxidação (LPO). Este

processo provoca alterações estruturais e funcionais da membrana, que prejudicam o metabolismo, podendo levar à morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; SAMPAIO; MORAES, 2010).

A lipoperoxidação pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos RL sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (RIEGEL, 2004).

A LPO talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada ou saída de nutrientes, alterações do DNA com comprometimento dos componentes da matriz extracelular e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (LEHNINGER; COX; NELSON, 2002, LIMA; ABDALLA, 2001).

A LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado (AGPI) para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário. Nos sistemas biológicos, a LPO pode ocorrer por duas vias: uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos AGPI e a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, metais de transição e outros radicais livres (LIMA; ABDALLA, 2001).

A lipoperoxidação pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Entretanto nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória, todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SAMPAIO; MORAES, 2010).

Os produtos resultantes da peroxidação lipídica são parâmetros importantes para o monitoramento do dano causado por ERO e ERN em lipídeos (FERREIRA;

MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007). Esses são instáveis e se degradam em vários produtos secundários como o malonaldeído (MDA) e substâncias semelhantes a esta, que são chamadas de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), o qual promove informação significativa sobre as avaliações. Os níveis de MDA são largamente utilizados como marcadores da peroxidação lipídica nos estados de estresse oxidativo elevados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; YILDIRIM et al., 2007).

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos em radicais altamente reativos (alcoxila e peroxila), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação. Essas reações, que podem ser rápidas ou lentas, dependem da valência do ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

## 6.6 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são substâncias as quais, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, poderiam atrasar ou inibir as taxas de oxidação. São moléculas que neutralizam radicais livres, aceitando ou doando elétrons para eliminar a condição desemparelhada do radical. As moléculas antioxidantes podem reagir diretamente com os RL reativos e destruí-las (ROCHA, 2007, LÜ et al., 2010).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células, impedindo o ataque destas espécies reativas sobre os lipídeos, os aminoácidos e as bases do DNA, evitando a perda da integridade celular. Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos: o primeiro mecanismo de defesa contra os RL é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O oxigênio é perigoso para os seres vivos, e organismos aeróbios sobrevivem à sua presença apenas porque contêm defesas antioxidantes. Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante.

Esses agentes são gerados de forma endógena como consequência direta do metabolismo do oxigênio e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de  $O_2$ . Sendo assim, durante o metabolismo aeróbio, a possibilidade de ocorrer lesão oxidativa nos tecidos vai depender de um preciso equilíbrio entre a geração de radicais de oxigênio e a eficácia dos mecanismos antioxidantes (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; VASCONCELOS et al., 2007).

Dada a grande diversidade de produção de RL, as células eucarióticas desenvolveram mecanismos elaborados de defesa celular. A existência de um sistema de defesa antioxidante enzimático, bem como de um não-enzimático permite a estes organismos sequestrar e destruir RL, como também reparar as lesões provocadas aos constituintes celulares e contribuir para a manutenção do equilíbrio redox intracelular (LÜ et al, 2010).

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes tanto no organismo como nos alimentos ingeridos respectivamente. No sistema enzimático, estão presentes as enzimas superóxido-dismutase (SOD), glutaciona-peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (ANTUNES-NETO; SILVA; MACEDO, 2005, LÜ et al, 2010).

Os antioxidantes destroem os radicais livres como o radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila (OH). Enzimas endógenas como a superóxido dismutase (SOD), presente em quase todas as células, catalisa a conversão do  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio. O  $H_2O_2$ , produzido na reação, pode reagir com outras espécies de oxigênio reativo, e é degradado em água e oxigênio por outras enzimas, como a catalase e pela glutaciona-peroxidase, que usa a glutaciona (GSH) como agente redutor. Esta última enzima catalisa a degradação de hidroperóxidos orgânicos (VOET; VOET; PRATT, 2000).

Dos componentes não-enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina

E, vitamina A), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína), bioflavonóides (genisteína, quercetina) e taninos (catequinas) (SHAMI; MOREIRA, 2004).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático inclui as moléculas que interagem com as espécies radicalares que são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos. O processo de reparo das lesões está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Os estudos com antioxidantes têm ressaltado o uso de nutrientes isolados na correlação com o tratamento e prevenção de doenças e retardo do envelhecimento (BIANCHI; ANTUNES, 1999; MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004; DANI et al., 2008).

Os componentes celulares não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos, e é bem estabelecido que antioxidantes obtidos da dieta sejam indispensáveis à defesa apropriada contra oxidação e, portanto, têm importante papel na manutenção da saúde. Os incontestáveis benefícios à saúde, associados ao consumo de frutas e hortaliças, devem-se, em parte, à presença de antioxidantes nestes alimentos (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

## 6.7 ALGAS E O POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Nas células de organismos fotossintetizantes, como as cianobactérias, os mecanismos fisiológicos e biomoleculares de defesa contra espécies reativas de oxigênio estão fortemente desenvolvidos, uma vez que as membranas fotossintéticas são alvo primário para os efeitos deletérios oxidativos. As algas estão sempre sendo submetidas a rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de oxigênio e gás carbônico ao longo da coluna de água e, assim, sua sobrevivência depende de uma resposta eficiente ao estresse oxidativo. Por essa razão, esses organismos podem representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais tanto para as indústrias alimentícias como para as farmacêuticas (ROCHA et al., 2007).

O interesse inicial pelo estudo de substâncias com atividade antioxidante em algas surgiu no Japão, na busca de novos aditivos para alimentos, em substituição

àqueles antioxidantes sintéticos utilizados, os quais mostravam efeitos carcinogênicos, alterações enzimáticas e lipídicas em animais. O fato de algumas algas secas poderem ser estocadas por um longo período sem o perigo de deterioração oxidativa, mesmo apresentando mais de 30% do total de seus ácidos graxos na forma de cadeias poliinsaturadas, despertou o interesse dos pesquisadores em relação ao mecanismo presente nessas algas (FUJIMOTO; KANEDA, 1980).

As algas também são ricas em polissacarídeos e minerais, entretanto, poucas têm sido utilizadas amplamente como plantas comestíveis. A efetividade antioxidante de fontes naturais foi relacionada por diversos autores aos compostos fenólicos, que ocorrem naturalmente em plantas terrestres e aquáticas (RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004).

#### 6.8 MICROALGA *Spirulina platensis*

A *Spirulina platensis* é uma *Cyanobacterium* classificada como Cyanophyta ou grupo das algas verde-azuladas (CASTENHOLZ et al., 2001). O gênero *Spirulina* apresenta diversas espécies, dentre elas *S. platensis*, *S. máxima*, *S. fusiformis* e *S. major*. As espécies *S. platensis* e *S. máxima* são as mais estudadas para uso na alimentação humana por apresentarem perfil nutricional o que as torna ideal para serem utilizadas como suplemento alimentar, pois substituem as fontes artificiais de nutrientes, por combinar diversos constituintes de maneira equilibrada (AMBROSI et al., 2008).

A produção mundial de *S. platensis* é liderada pelos Estados Unidos, seguido pela Tailândia, Índia, Japão e China. A *Spirulina* está legalmente autorizada para consumo como alimento ou complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos. Recentemente, a Food and Drug Administration (FDA), 2003, emitiu o primeiro certificado Generally Recognized as Safe (GRAS) para a *Spirulina*, deliberando que ela poderia ser utilizada como alimento sem apresentar risco à saúde. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009) passou a reconhecer a *Spirulina* como ingrediente que pode ser utilizado nas formulações de alimentos, sendo que a recomendação diária de consumo do produto deve ser limitada a 1,6 g.

As cianobactérias possuem pigmentos, incluindo carotenóides, clorofila e biliproteínas, os quais conferem diferentes propriedades funcionais. A *Spirulina platensis* tem como seu principal pigmento a ficobiliproteína ficocianina. Para tal, esta cianobactéria apresenta-se como estimulante ao sistema imunológico (HENRIKSON, 1995; ANDREWS et al., 2010).

Em muitos países, o pigmento (ficocianina) é utilizado como suplemento alimentar, devido ao seu potencial nutracêutico, anti-inflamatório (SHIH et al., 2009, DENG; CHOW, 2010), antibacteriano (OZDEMIR et al., 2004), no perfil lipídico (RISS, et al., 2007; COLLA; BAISH; COSTA, 2008; BERTOLIN et al., 2009), na prevenção de certos tipos de cânceres (LIU et al., 2000; HIRAHASHI et al., 2002, WU et al., 2011), neuroprotetor e anti-estressor do sistema nervoso. A ficocianina atua diminuindo a patogenicidade de doenças neurológicas ativando a microglia em doenças neurodegenerativas e exibe um efeito preventivo sobre infecções virais (SHIH et al., 2009; THAAKUR; SRAVANTHI, 2010, WU et al., 2011).

A ficocianina, como principal pigmento da cianobactéria *Spirulina platensis*, pode chegar a 20% em peso seco. Este pigmento apresenta-se como estimulante ao sistema imunológico, aumentando a contagem de leucócitos e propriedades antioxidantes, pois é capaz de sequestrar radicais hidroxil (SOUZA, 2006).

Além das propriedades citadas alguns trabalhos descrevem a capacidade antitumoral da ficocianina. Esta capacidade seria devido à indução de apoptose em células cancerígenas (SOUZA, 2006).

## 6.9 RESTRIÇÃO CALÓRICA

A Restrição calórica (RC) caracteriza-se pela redução da ingestão de calorias de 20-40%, abaixo do ad libitum, sem desnutrição, é uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas na atualidade para estender o tempo de vida (KOUBOVA; GUARENTE, 2003; GENARO; SARKIS; MARTINI, 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, nematóides, camundongos e macacos. Além de estender a expectativa de vida, a RC também se associa a redução de doenças relacionadas à idade, levando à sugestão de que RC poderia ser utilizada para aumentar a longevidade em seres humanos (SCHLEIT et al, 2011).

A relação inversa entre a ingestão de calorias e aumento da expectativa de vida em ratos sugere que a RC desenvolve um mecanismo de regulação do metabolismo energético, induzindo a uma reprogramação metabólica que pode ser um evento importante no mecanismo da longevidade (COLMAN et al. 2009).

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

A restrição calórica parece diminuir a neurodegeneração do cérebro, causada pela doença de Alzheimer e Parkinson, este fato foi verificado em estudo realizado com primatas induzidos à doença de Parkinson, onde mostraram menor déficit motor naqueles com restrição calórica de 30% quando comparados a primatas que ingeriram uma dieta normal. Na análise neuroquímica, observou-se também que as concentrações de dopamina e de dois de seus metabólitos estavam mais elevadas no grupo com RC (GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009).

Estudo que examinou os efeitos da RC com duração de 6 a 14 semanas em camundongos com doença de Alzheimer, verificou uma diminuição substancial de 50% na imunorreatividade da beta-amilóide peptídeo que se acumula na massa cerebral nesta doença (GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009).

A RC desencadeia um mecanismo de proteção da vida, permitindo que organismos sobrevivam a períodos de escassez alimentar. Contudo, a existência desse mesmo mecanismo em humanos não se encontra totalmente esclarecida. Entretanto, a escassez de alimentos durante a Segunda Guerra Mundial foi associada a uma diminuição de mortalidade por doença coronariana nos países europeus (GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009).

Como os efeitos da 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 verificaram que dos 76 animais que participaram da pesquisa, obtiveram um percentual de morte por causas relacionadas ao envelhecimento de 37% dos macacos do grupo controle, enquanto que os do grupo em RC a mortalidade foi de 13%. Bem como verificou-se menor incidência de doenças cardiovasculares e câncer no grupo sobre RC.

Algumas hipóteses têm sido propostas como a hipótese da 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).

Segundo Sohal; Weindruch, 1996; Mannarino et al, 2008; Mannarino et al., 2010, a RC pode prorrogar o tempo de vida, devido a resistência às espécies reativas de oxigênio e a diminuição da produção destas espécies. Estes autores também relatam que 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<sup>+</sup>).

Em 2000, foi sugerido que RC era um mecanismo regulável e dependente da atividade do gene SIR2 (*silent information regulator 2*), em leveduras (LIN; DEFOSSEZ et al., 2000). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que com a deleção do gene SIR2, o efeito na extensão do tempo de vida da levedura, quando em RC, era bloqueado. Ainda, foi determinado que este efeito sobre o aumento da atividade enzimática de SIR2 era dependente do co-substrato NAD<sup>+</sup> (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo). Sendo a forma reduzida, NADH, um inibidor competitivo de sirtuína, foi sugerido que um aumento na razão NAD<sup>+</sup>/NADH, geraria uma alteração no metabolismo oxidativo, que poderia aumentar a atividade de sirtuínas e, subsequentemente, aumentar a longevidade em leveduras (LIN et al., 2004).

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, 2009).

As proteínas SIR2 podem, através da restrição calórica, regular a longevidade, aumentando níveis de NAD disponível. A atividade do gene SIR2 é elevada, resultando em maior silenciamento e como consequência, uma vida mais longa, sendo que a superexpressão do gene resulta em prolongamento da longevidade (GUARENTE, 2000; KAEBERLEIN et al., 2004; ALMEIDA, 2007; HERRANZ; SERRANO, 2010; UNNIKRIISHNAN; GAFKEN; TSUKIYAMA, 2010).

Pesquisas realizadas com leveduras investigando os efeitos da RC indicam que a SIR2 é necessária para a extensão da vida útil replicativa quando utilizado meio de cultura na concentração de 0,5% de glicose. Observou-se que, nestas condições, a vida do modelo experimental em questão aumento 25% em relação ao meio de cultivo

utilizando 2% de glicose, bem como se verificou que a eliminação da SIR2 impediu a extensão da vida (LIN et al., 2002).

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

Kaeberlein (2010) colabora com estes achados afirmando que a importância das sirtuínas no envelhecimento foi estabelecida em estudos mostrando que a superexpressão de SIR2 pode aumentar o tempo de vida, enquanto a sua supressão pode diminuir a longevidade. Estudos recentes propõem que as identificações de mediadores genéticos e fisiológicos da CR poderiam auxiliar na descoberta de tratamentos que agem sobre as vias metabólicas, imitando assim os aspectos positivos da RC, sem a imposição de restrição alimentar.

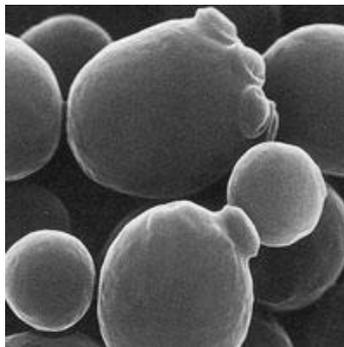
#### 6.10 LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO EXPERIMENTAL

As leveduras são microrganismos unicelulares eucarióticos, de ocorrência no solo, na água, nos vegetais, nos insetos, animais e no homem. O vento age como veículo de disseminação do grupo, por isso, esta ampla diversidade de ambientes. A reprodução destes organismos ocorre principalmente por sucessivas divisões mitóticas através de brotamento das células filhas (MARIANI, 2008).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2) é considerada um dos modelos de sistema eucariótico unicelular mais importante para estudos relacionados ao envelhecimento. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica, que não estão presentes em bactérias. A levedura *S. cerevisiae* desempenha um importante papel ao nível de processos biotecnológicos, sendo ainda amplamente utilizada como modelo experimental em estudos de biologia. Esta levedura é não patogênica, facilmente cultivada em laboratório em condições pré-determinadas e passíveis de serem controladas pelo manipulador (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005, KAEBERLEIN, 2010).

Células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam semelhanças notáveis com células animais, tanto em relação às suas organelas como também às suas biomoléculas, sendo que leveduras e humanos possuem vários genes em comum e várias vias metabólicas são conservadas em ambos os organismos. Dessa maneira, estudos sobre a função de uma proteína humana, podem ser realizados em pesquisas com leveduras e genes que são envolvidos em doenças humanas podem ser expressos nas mesmas, e suas interações com outros componentes da célula eucariótica podem também ser estudadas (MANNARINO, 2009).

O modelo de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quando comparado a outros sistemas, permite quantificar a longevidade e avaliar a atividade antioxidante de compostos de forma rápida, econômica e reprodutível. Os resultados obtidos podem ser extrapolados para o homem, com relativa facilidade, em relação aos obtidos em ensaios químicos. Os estudos em células eucarióticas possibilitam a compreensão dos mecanismos moleculares do envelhecimento pela identificação de fatores que modificam o aumento da longevidade (PIPER, 2006; MANNARINO et al., 2008; KAEBERLEIN, 2010).



Fonte: ADAMIS (2006).

Figura 2: Células de *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido muito utilizada como modelo de estudo para modulação da longevidade. Dois tipos de longevidade podem ser medidas em *S. cerevisiae*, a longevidade cronológica e replicativa. A sobrevivência limitada de células de levedura em uma cultura estacionária é chamada envelhecimento cronológico e é pensado para modelar o envelhecimento das células pós-mitóticas de organismos

superiores (ZADRAG; BARTOS; BILINSKI, 2008; MESQUITA et al., 2010). A longevidade cronológica é medida na fase estacionária do crescimento, na qual a taxa de reprodução é baixa, ou submetendo as células a condições não proliferantes após sua retirada do meio de cultura. Células de levedura nessa fase são um excelente modelo para o estudo do envelhecimento de células somáticas de eucariontes superiores, uma vez que ambas são células pós-mitóticas e dependem da respiração mitocondrial para manter a viabilidade (SINCLAIR; GUARENTE, 1997, HARRIS et al., 2003, REVERTER-BRANCHAT et al., 2004, MANNARINO, 2009).

Espera-se que fatores que influenciam a longevidade cronológica sejam diferentes daqueles que alteram a longevidade replicativa, que é definida pelo número de gerações que uma célula de levedura produz na fase exponencial do crescimento. Em mamíferos, a longevidade replicativa tem sido relacionada ao encurtamento dos telômeros (extremidades dos cromossomos), causado principalmente pelo acúmulo de danos oxidativos no DNA telomérico. (MANNARINO, 2009).

A levedura vem sendo empregada como um modelo versátil para o estudo de doenças neurodegenerativas, usada também no estudo de inúmeras desordens neurológicas. A principal vantagem do uso de levedura é de ser um organismo simples, de reduzida complexidade em comparação com os modelos de mamíferos. Leveduras também oferecem a vantagem de uma genética e proteômica poderosas, incluindo um genoma completamente sequenciado (BHARADWAJ; MARTINS; MACREADIE, 2010).

O modelo de RC em leveduras *S. cerevisiae* é realizado através da diminuição da glicose no meio de cultura de 2% para 0,5% levando a um aumento do tempo de vida replicativo (LIN et al., 2004) e do tempo de vida cronológico (TAHARA et al., 2007).

#### 6.10.1 CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

No início do crescimento, as células de levedura passam por um período de adaptação, conhecido como fase lag (Figura 3). Estas células possuem também duas fases exponenciais quando estão crescendo em glicose como fonte de carbono. Na fase

exponencial do crescimento, as células usam glicose para produção de energia, ocorrendo à fermentação (GOMES, 2007).

Com o esgotamento da glicose, as células de levedura entram na fase de diauxia, uma segunda fase de adaptação, sem crescimento, em que as células se adaptam para usar o etanol principal produto da fermentação como fonte de carbono. Uma vez esgotado o etanol ou outro nutriente essencial, as células de levedura entram na fase estacionária de crescimento, onde não há mais divisões celulares e a taxa metabólica diminui. Entretanto as células podem sobreviver por semanas ou meses utilizando suas reservas (GOMES, 2007). As fases do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, podem ser observadas na figura abaixo.



Fonte: GOMES, 2007.

Figura 3: Fases de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Gráfico relacionando o crescimento da levedura em mg/mL com o tempo.

## 6.11 SIRTUÍNAS

As sirtuínas foram inicialmente isoladas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em estudos realizados por Sinclair e Guarente em 1997. Elas compreendem um grupo de proteínas desacetiladoras dependentes da coenzima NAD<sup>+</sup> (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), envolvidas no controle do metabolismo energético e

associadas à longevidade. Além das histonas, um crescente número de proteínas tem sido identificado como alvo das sirtuínas, entre eles estão proteínas estruturais e diversos fatores de transcrição (GALLINARI et al., 2007).

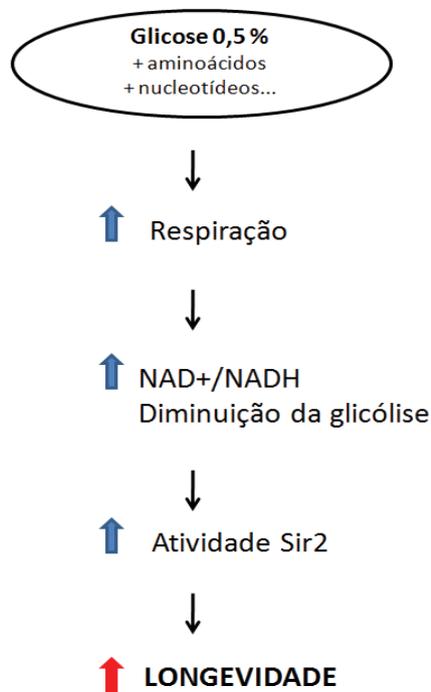
A restrição calórica estimula as sirtuínas que inibem a expressão do fator de transição nuclear Kappa B (NF-kB), reduzindo a inflamação, a imunossenescência e o envelhecimento celular. As sirtuínas desempenham funções como a regulação do tempo de vida, reparo de danos no DNA, resistência celular ao estresse e regulação metabólica. As sirtuínas também atuam sobre vários substratos importantes, dentre eles destacando a proteína p53 (relacionada a apoptose celular), fatores de transcrição como FOXO-3, relacionado à resposta celular ao estresse e FOXO-1, relacionado à carcinogênese, PPAR  $\gamma$ , relacionado ao metabolismo lipídico, PGC-1  $\alpha$ , relacionado à gliconeogênese, entre outros cujas ações estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças ligadas ao envelhecimento (TROTТА, 2010; SILVA; FERRARI, 2011).

Organismos como bactérias, codificam apenas uma sirtuína, já eucariotos possuem múltiplas sirtuínas, como as leveduras contendo quatro (Sir1, Sir 2, Sir3, Sir4). Em mamíferos esta família consiste de sete membros (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7), e diferenciam-se quanto à função e localização celular (GAN; MUCKE, 2008).

A SIR2 foi a primeira proteína sirtuína descrita por atuar no prolongamento da vida. Em leveduras a SIR2, é um dos principais determinantes da longevidade. Atualmente existem sete homólogos da SIRT2 descritos em mamíferos, todos desempenham suas funções através da desacetilação dependente de  $\text{NAD}^+$ . Dentre estes homólogos, a SIRT1 tem sido extensamente estudada. Sua ação relaciona-se principalmente ao reparo de danos no DNA, estresse oxidativo, além de atuar sobre tecidos metabolicamente ativos como pâncreas, tecido adiposo e fígado. Em relação ao reparo de danos ao DNA, a SIRT1 regula positivamente a estabilidade genômica, deacetilando fatores envolvidos neste fenômeno (LIANG; KUME; KOYA, 2009; FINKEL; MOSTOSLAVSKY; DENG, 2009; TROTТА, 2010).

As proteínas *sir2* podem através da RC regular a longevidade, aumentando níveis de NAD disponível. A atividade do gene *sir2* provavelmente é elevada, resultando em maior silenciamento e como consequência, uma vida mais longa, sendo que a superexpressão do gene resulta em prolongamento da longevidade (KAEBERLEIN et al., 2004; ALMEIDA, 2007; HERRANZ; SERRANO, 2010; UNNIKRISHNAN; GAFKEN; TSUKIYAMA, 2010), enquanto a supressão da *sir2* diminui o tempo de vida útil (LIN et al., 2002; KABERLEIN, 2010) (Figura 4).

Figura 4: Mecanismo de ativação do gene *sir2* através da restrição calórica



*Fonte: Adaptado de Koubova e Guarente, 2003.*

Enquanto cada sirtuína é um produto de um gene específico, a expressão destes genes e a atividade das enzimas nos tecidos são fortemente afetadas por mudanças no ambiente como dieta e estilo de vida. Alguns fatores reportados por influenciarem na expressão destes genes incluem: RC, exercício, álcool, fumo, exposição ao frio, estresse

oxidativo, administração de compostos como resveratrol, quercetina e melatonina (KELLY, 2010).

Diferentes autores sugerem que a modulação das sirtuínas seja, no futuro, um possível caminho para aliviar os efeitos e complicações do envelhecimento (WESTPHAL et al., 2007, YAMAMOTO et al., 2007; OUTEIRO et al., 2008) como a diabetes, o câncer, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (MICHAN; SINCLAIR, 2009).

Como cada sirtuína é um produto de um gene específico, a expressão destes genes e a atividade das enzimas nos tecidos são fortemente afetadas por mudanças no ambiente como dieta e estilo de vida. Alguns fatores são referidos por influenciarem na expressão destes genes e incluem: RC, exercício, álcool, fumo, exposição ao frio, estresse oxidativo, administração de compostos como resveratrol, quercetina e melatonina (KELLY, 2010).

## 7 HIPÓTESES / PRESSUPOSTOS

A utilização do antioxidante ficocianina e da RC favorece a sobrevivência celular e reduz os danos oxidativo de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2Δ*, em resposta aos eventos do envelhecimento quando este é submetido ao estressor  $Fe^{2+}$ .

## 8 METODOLOGIA

### 8.1 LOCAL DO ESTUDO

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Fermentações no curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo.

### 8.2 ANTIOXIDANTE

O composto antioxidante analisado foi o extrato da *Spirulina platensis*, a qual é proveniente do Laboratório de Engenharia Bioquímica do curso de Engenharia de Alimentos da FURG-RS.

### 8.2.1 EXTRATO AQUOSO DE *Spirulina platensis*

O extrato da *Spirulina platensis* foi obtido através do processo de congelamento e descongelamento. Para a extração foi utilizada 1 g da microalga e adicionados 30 mL de água, com posterior acondicionamento em embalagem plástica com tampa. Estas embalagens foram congeladas a 0 °C por 3 h e após esse período foram descongeladas a 4 °C (COSTA et al., 2005).

Os processos de congelamento e descongelamento aconteceram de forma sucessiva por três vezes. Após estas amostras foram submetidas à centrifugação a 6000 rpm por 15 min.

O sobrenadante foi extraído, sendo este o extrato de *Spirulina platensis*. A concentração do extrato de *Spirulina platensis* foi determinada através da Equação 1, de acordo com Benett e Bogorad (1973).

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

Onde:

FC = concentração de ficocianina (mg/mL)

Abs620 = absorvância em 620 nm

Abs652 = absorvância em 652 nm.

### 8.3 MODELO EXPERIMENTAL

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2Δ* e controle foram obtidas da Euroscarf, Frankfurt, Germany. O Quadro 1 apresenta as linhagens que serão utilizadas nos experimentos.

**Quadro 1:** Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* prevista para o estudo

Cepas	Genótipos
*BY4741	MAT A; his 3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0
SIR 2	Isogênica a by4741 exceto o gene Sir 2::kmx4

\*Cepa Controle (C).

As linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* serão mantidas em meio YPD sob refrigeração a 4 °C, como apresentado no Quadro 1. A manutenção dos micro-organismos será realizada através de repiques periódicos em meio YPD. No caso da cepa mutante *sir2 $\Delta$* , o meio de cultura será acrescido de 0,02 % de geneticina. As culturas serão mantidas a 4° C em ágar inclinado (cultura estoque).

**Tabela 1:** Meio YPD de manutenção da levedura

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

#### 8.4 MEIOS DE CULTURA

A Tabela 2 apresenta os meios de cultivo utilizados para obtenção da massa celular adequada para realização dos experimentos, meio YPD 2 % e o meio YPD 0,5 % utilizado para a simulação da restrição calórica.

**Tabela 2:** Meio YPD de cultivo para cultivo das cepas

Componentes	Composição (%)
Glicose	2 (C) e 0,5 (RC)
Peptona	2
Extrato de levedura	1
Ágar	2
Extrato de <i>Spirulina platensis</i>	Presença ou ausência
Fe <sup>2+</sup>	Presença ou ausência

## 8.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As células, retiradas de um repique fresco em meio sólido YPD 2 %, serão cultivadas em erlenmeyers, contendo 20 % do seu volume preenchido por meio YPD 2 % ou YPD 0,5 %. Após a realização do inóculo, as culturas serão incubadas a 28 °C em agitador orbital ajustado para 160 rpm até a primeira fase exponencial de crescimento (entre 0,5 e 0,9 mg de peso seco de células/mL). Nesta fase, as células crescidas em YPD 2 % apresentam um metabolismo fermentativo, utilizando a glicose presente do meio como única fonte de carbono e não dependendo do oxigênio como acceptor final dos elétrons. Já as células de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em YPD 0,5 %, devido à baixa repressão catabólica causada pela pouca quantidade de glicose, representam condições de um metabolismo parcialmente respiratório. Estas condições metabólicas serão escolhidas para verificar a capacidade do extrato de *Spirulina* no mimetismo da restrição calórica.

## 8.6 CRESCIMENTO CELULAR

A avaliação do crescimento celular foi determinada em espectrofotômetro, através da medida da absorbância a 570 nm de uma suspensão de células convertida em concentração de células (mg de peso seco de células/mL). O fator de conversão em peso seco foi calculado a partir da filtração de um volume adequado da suspensão de células em filtro Millipore (0,45 µm), que, posteriormente, será secado em estufa a 80 °C até atingir o peso constante.

## 8.7 TESTE DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *Spirulina platensis*

As células na primeira fase exponencial do crescimento celular foram expostas durante 1 h em concentrações crescentes do extrato de *Spirulina platensis* (0,08-0,8mg/mL). Esta exposição foi necessária para estabelecer a concentração ideal para as análises bioquímicas do efeito deste extrato.

A partir de uma solução padrão de extrato de *Spirulina*, de concentração conhecida, foi calculado o volume necessário para as concentrações desejadas, os quais foram adicionados no meio de cultivo. Após as células foram incubadas a 28 °C com

agitação constante de 160 rpm durante 1 h. Posteriormente, foram coletados 400 µg de células para realizar o plaqueamento, após diluição adequada. As colônias foram contadas após 72 h de crescimento em estufa a 28 °C. O percentual de tolerância foi calculado a partir da razão entre o número de colônias obtidas em meio YPD 2 % após e antes da exposição ao extrato de *Spirulina* (DANI et al., 2008).

## 8.8 TESTE DE CITOTOXICIDADE DO ESTRESSOR Fe<sup>2+</sup>

As células na primeira fase exponencial do crescimento celular foram expostas durante 1 h em concentrações crescentes de sulfato ferroso (0,5 mM, 1 mM e 4mM). Esta exposição foi necessária para estabelecer a concentração ideal para as análises bioquímicas do estressor ferro.

A partir de uma solução padrão de sulfato ferroso, de concentração conhecida, foi calculado o volume necessário para as concentrações desejadas, os quais foram adicionados no meio de cultivo. Após as células foram incubadas a 28 °C com agitação constante de 160 rpm durante 1 h. Posteriormente, foram coletados 400 µg de células para realizar o plaqueamento, após diluição adequada. As colônias foram contadas após 72 h de crescimento em estufa a 28 °C. O percentual de tolerância foi calculado a partir da razão entre o número de colônias obtidas em meio YPD 2 % após e antes da exposição ao ferro.

## 8.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi realizado conforme apresentado no Quadro 2.

**Quadro 2:** Delineamento experimental para verificação do efeito da restrição calórica e da *Spirulina platensis* no cultivo da *Saccharomyces cerevisiae*

<b>Tratamentos</b>	<b>Cultivos</b>
01	Padrão (P)
02	Restrição calórica (RC)
03	Padrão acrescido de extrato de <i>Spirulina platensis</i> (PSp)
04	Padrão + Íon Fe <sup>2+</sup> (PFe <sup>2+</sup> )
05	Restrição calórica + Íon Fe <sup>2+</sup> (RCFe <sup>2+</sup> )
06	Padrão acrescido de extrato de <i>Spirulina platensis</i> + Íon Fe <sup>2+</sup> (PSpFe <sup>2+</sup> )

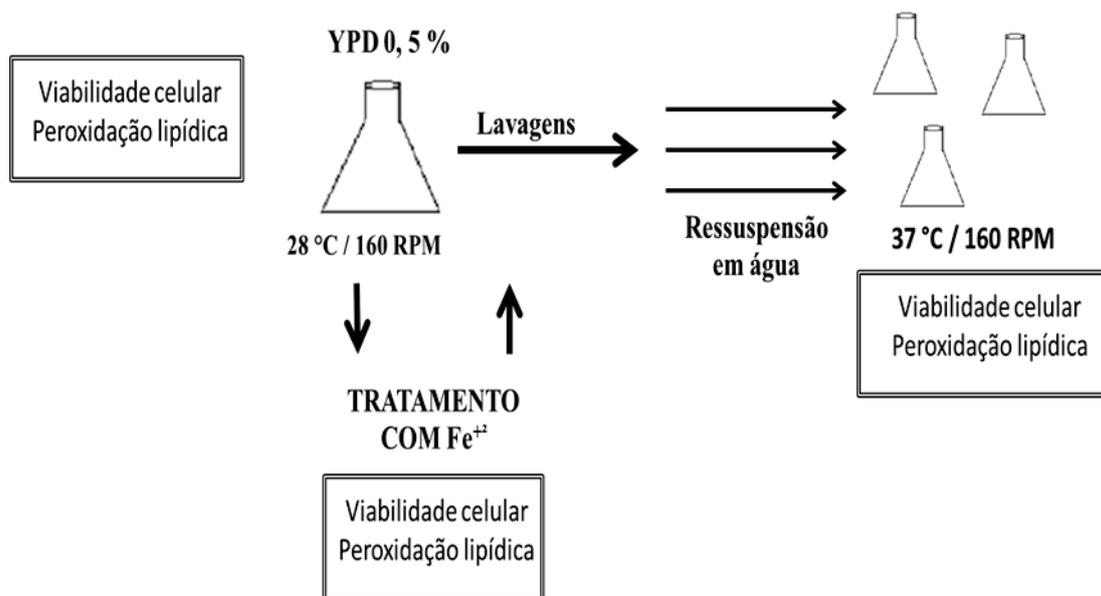
A condição experimental prevista no Quadro 2 será aplicada para as cepas apresentadas no Quadro 1.

## 8.10 SIMULAÇÃO DO ENVELHECIMENTO CRONOLÓGICO

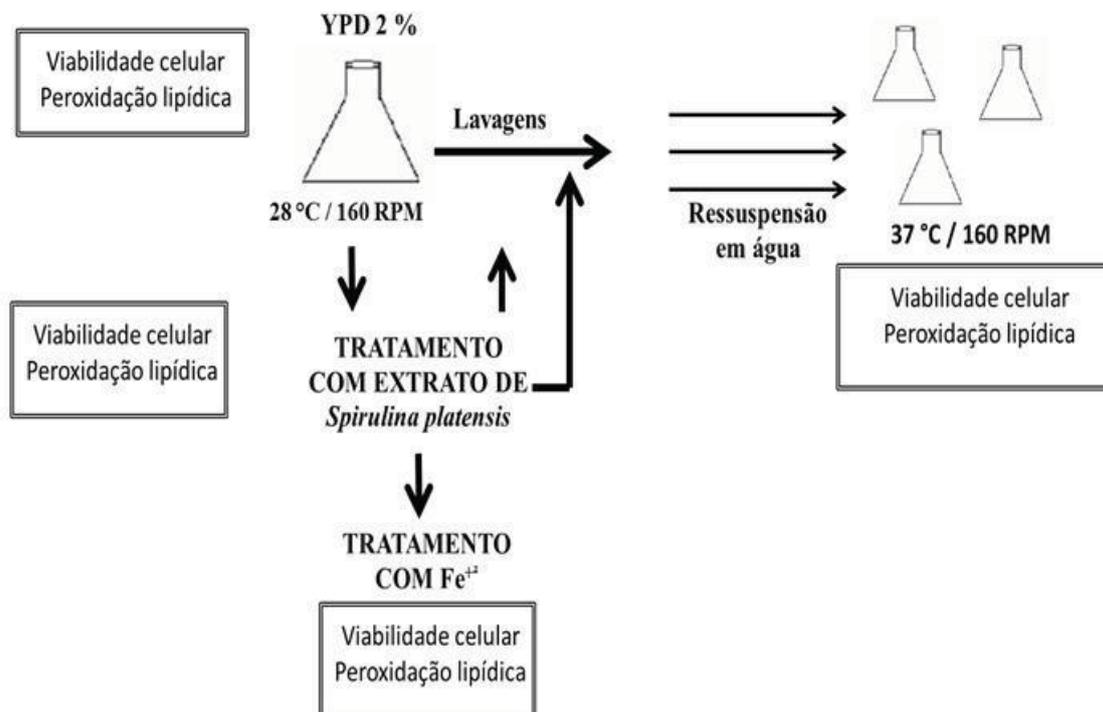
Aproximadamente 30 mg de células foram coletadas e lavadas duas vezes com água destilada estéril. Após a última lavagem, o centrifugado foi ressuspensão em 10 mL de água destilada estéril e transferido para um erlenmeyer de 50 mL. Este erlenmeyer foi, então, incubado a 37 °C em um agitador rotatório ajustado para 160 rpm pelo tempo necessário para a realização dos experimentos.

Ao meio fresco de cultura de células crescidas em YPD 2 %, foi adicionada ou não uma dose previamente testada do extrato de *Spirulina platensis* e de  $Fe^{2+}$ , por cerca de 1 h a 28 °C / 160 rpm. As células foram submetidas a estas formas de tratamento adaptativo e posteriormente expostas ao processo de envelhecimento cronológico, como mostrado nas Figuras 5 e 6.

**Figura 1:** Estratégia experimental – Tratamentos em 0,5 % de glicose



**Figura 2:** Estratégia experimental – Tratamentos em 2 % de glicose



## 8.11 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi analisada em meio sólido YPD 2 % antes e após envelhecimento (ELEUTHERIO et al., 1995). As placas foram incubadas a 28 °C por 72 h e o número de colônias contado. O percentual de sobrevivência foi determinado através da Equação 2, de acordo com Eleutherio et al. (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

## 8.12 OXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS PELO MÉTODO DE TBARS

Inicialmente foram recolhidas por centrifugação cerca de 50 mg de células antes e após 1 e 24 h de exposição a 0,8 mg/mL de extrato de *Spirulina platensis*, bem como, expostas ao estressor  $\text{Fe}^{2+}$  1mM. As células foram lavadas duas vezes com água destilada gelada, ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de TCA 10% (ácido tri-cloro acético) e transferidas para tubo de parede grossa. Foram adicionadas 1,5g de pérolas de vidro e as células rompidas sob agitação vigorosa com 6 ciclos de 20 s no vortex e 20 s no gelo.

O extrato foi recolhido em micro tubo e as pérolas de vidro lavadas com 500  $\mu\text{L}$  de TCA 10%, sendo recolhidos no mesmo eppendorf. Após a lise os extratos foram centrifugação 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 realizado conforme a Tabela 3.

**Tabela 3:** 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
Ac. Tiobarbitúrico 1% em NaOH 0,05M	0,6	0,6	0,6
Volume total	1	1	1

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

A dosagem foi 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).

$$MDA = \frac{(Abs\ 532 \times f') \times 1000}{(Abs\ 570 \times f \times 100) \times 4,9 \times 0,15} \quad (3)$$

Onde:

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

Abs 532 = absorvância medida sob comprimento de onda de 532 nm;

Abs 570 = absorvância medida sob 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 *Saccharomyces*

*cerevisiae*

100 = diluição realizada para medir a absorvância.

### 8.13 CURVA PADRÃO DO TMP (1,1,3,3 TETRAMETOXIPROPANO)

A curva padrão de TMP (1,1,3,3 tetrametoxipropano) foi obtida com concentrações de 0,08 nmol a 1,2 nmol, a partir de uma solução padrão (0,02 nmol de TMP). A solução padrão foi utilizada para o preparo das diferentes concentrações de TMP (Tabela 4).

**Tabela 4:** Procedimento experimental para a confecção da curva com padrão TMP (1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano)

Balão	Sol. Padrão (mL)	TCA 10 % (mL)	Concentração Sol. Padrão (nmol)
Branco	0	50,0	0,00
1	1,0	49,0	0,08
2	2,0	48,0	0,16
3	4,0	46,0	0,32
4	6,0	44,0	0,48
5	7,0	43,0	0,56
6	8,0	42,0	0,64
7	9,0	41,0	0,72
8	11,0	39,0	0,88
9	12,0	38,0	0,96
10	14,0	36,0	1,12
11	15,0	35,0	1,20

TMP = 1,1,3,3 tetrametoxipropano; TCA = ácido tricloroacético

O ensaio foi realizado com a mistura reacional contendo 0,15 mL de solução em diferentes concentrações, 0,15 mL de água, 0,10 mL de EDTA 0,1M e 0,6 mL de ácido tiobarbitúrico 1% em NaOH 0,05M. A mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 min. Os tubos foram resfriados e a leitura foi efetuada a 532 nm em espectrofotômetro.

#### 8.14 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados serão avaliados por análise de variância ANOVA e teste de t de Studente a 5% de significância, utilizando-se o programa PASW Statistics 18.0.

#### 9 CRONOGRAMA

A execução do projeto ocorrerá no período entre março de 2011 a dezembro de 2012. O quadro a seguir descreve as metas e resultados, ações e atividades, período de execução e aplicação de recursos previstos para a conclusão do projeto de dissertação.

<b>Ações e atividades</b>	<b>Período de execução</b>
Definir a problemática e questão de pesquisa	Mar./2011 a Abr./2011
Planejamento da pesquisa	Mai./2011 a Ago./2011
Atualização da literatura	Ago./2011 a Maio de 2012
Qualificação da pesquisa	Mar./2012
Período experimental	Mar./2012 a Dez. 2012
Elaborar e apresentar produção científica vinculada à dissertação	Jun./2012 a Dez./ 2012

#### 10 ORÇAMENTO

Os materiais permanentes estão disponíveis no Laboratório de Fermentações da FEAR para utilização, não sendo necessária sua aquisição.

A tabela a seguir mostra os materiais utilizados na execução dos experimentos.

**Tabela 5:** orçamento de materiais utilizados para realização dos experimentos.

<b>Despesas de custeio</b>	
Materiais de expediente	R\$ 500,00
Passagens	R\$ 500,00
<b>Subtotal</b>	<b>R\$ 1.000,00</b>

<b>Equipamentos e materiais</b>	
Vidrarias	R\$ 1.000,00
Estufa	R\$ 1.510,00
Balança	R\$ 4190,00
Centrifuga	R\$ 925,00
Refrigerador	R\$1,099,00
Agitador de tubos	R\$385,00
Espectrofotômetro	R\$2.950,00
pH metro	R\$750,00
Reagentes	R\$500,00
<b>Subtotal</b>	<b>R\$13.309,00</b>
<b>Total</b>	<b>R\$ 14.309,00</b>

## 11 REFERÊNCIAS

ADAMIS, P. D. B. Acompanhamento do metabolismo de glutatião em células de *Saccharomyces cerevisiae* após o estresse com cádmio. 2006. 270 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.

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

AMBROSI, M. A. et al. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. *Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada*, v. 29, n. 2, p. 109-117, 2008.

ANDREWS, S. R. et al. Yeast extract, brewer's yeast and *Spirulina* in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. *Research in Veterinary Science*, v. 91, n.1, p. 103-109, 2010.

ANTUNES-NETO, J. M. F.; SILVA, L. P.; MACEDO, D.V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. *Revista Brasileira de Ciências e Movimento*, v.13, n.2, p.7-15, 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VII Lista dos novos ingredientes aprovados. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). ANVISA, 2009.

AUGUSTO, O. *Radicais livres: bons, maus e naturais*. Oficina de textos. 2006.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v.23, n.4, p. 629-643, 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*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

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.

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*, v. 52, p. 1253-1259, 2009.

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.

BHARADWAJ, P.; MARTINS, R.; MACREADIE, I. Yeast a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Research*, v.10, p.961-969, 2010.

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, 1999.

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.

BONSALL, M. Longevity and ageing: appraising the evolutionary consequences of growing old. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, v. 361, p. 119-135, 2006.

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.

CASTENHOLZ, R. W. et al. Form-genus XIII, *Spirulina* Turpin 1829 ex Gomont 1892. In: Boone DR, Castenholz RW, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd.ed. New York: Springer-Verlag, 2001, v.1, p.557-559.

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

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

COLLA, L. M.; BAISH, A. L. M.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, n.2 p. 405-411, 2008.

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 Influencia dos minerais na doença de Parkinson. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, São Paulo, SP, v. 32, n. 1, p. 77-88, abr. 2007.

DANI, C. et al. Antioxidant Protection of Resveratrol and Catequin in *Sacharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 4268-4272, 2008.

DE LIMA L. R. A.; RECH, C. R.; PETROSKI, L. E. Utilização da impedância bioelétrica para estimativa da massa muscular esquelética em homens idosos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion Organ Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, v. 58, n. 4, 2008.

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

DONMEZ, G.; GUARENTE, L. Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell*, v.9, n.2, p.285-290, Apr., 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; 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<sup>+</sup> metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity. *Chemical Biology*, v. 10, n. 2, 2010.

FARINATTI, P. T. V. Teorias biológicas do envelhecimento do genético ao estocástico. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*, v. 8, n. 4, p. 129-132, 2002.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/Foodingredien.htm>>. Acesso em: 20 de julho de 2011.

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*, Botucatu, n. 43, p. 61-68, 1997.

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.

FILIPSEN, E. K. et al. C. Associações do estado nutricional, homocisteinemia e suplementação de folato com a disfunção cognitiva de mulheres idosas. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 23, n. 4, p. 243-249, 2008.

FINKEL, T.; MOSTOSLAVSKY, R.; DENG, C. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, n. 30, p. 587-591, 2009.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. Extending Healthy Life Span - From Yeast to Humans. *Science*, v. 328, n. 16, abr., 2010.

FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. Screening test for antioxidigenic compounds from marine algae and fraction from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. *Bulletion of the Japanese Society of Scientific Fisheries* v.4, p. 1125-1130, 1980.

GALLINARI, P. et al. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research*, v. 17, p. 195-211, 2007.

GAN, L.; MUCKE, L. Paths of convergence: Sirtuins in aging and neurodegeneration. *Neuron*, v. 58, p.10-4, 2008.

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.

GOMES, D. S. *Estudo do Sistema Redox Glutarredoxina/Tiorredoxina em Resposta ao Estresse com Cádmio em células de Saccharomyces cerevisiae*. 2007. 133 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2007.

GUARENTE, L. *Sir2* links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Development*, v. 14, p. 1021-1026, 2000.

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

HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE, J. M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal Pharmacology*, v.142, n.2, p. 231-55, 2004.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *The Journal of Gerontology*, v.11, p.298-300, 1956.

HARMAN, D. The Aging Process. *Medical Sciences*, v. 78, n.11, p 7124-7128, 1981.

HARRIS, N. et al. Mnsod overexpression extends the yeast chronological (G(0)) life span but acts independently of Sir2p histone deacetylase to shorten the replicative life span of dividing cells. *Free Radical Biology & Medicine*, v.34, p.1599-1606, 2003.

HENRIKSON, R. *Microalga Spirulina: superalimento del futuro*. Barcelona: Ediciones Urano S. A., 1995.

HERRANZ, D.; SERRANO, M. SIRT1: Recent lessons from mouse models. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, p. 819-823, 2010.

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.

KAEBERLEIN, M. et al. *Sir2*-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *Plos Biology*, v. 2, n. 9, p. 1381-1387, 2004.

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.

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

KOUBOVA, J.; GUARENTE, L. "How does calorie restriction work?" *Genes & Development*, v.17, n.3, p.313-321, 2003.

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

LEADSHAM, J. E. et al. Apoptosis and the yeast actin cytoskeleton. *Nature Cell Death and Differentiation*, v. 17, p. 754–762, 2010.

LEHNINGER, A. L.; COX, M. M.; NELSON, D. L. *Lehninger princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 975 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.

LIANG, F.; KUME, S.; KOYA, D. SIRT1 and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 5, p. 367-373, 2009.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.37, n.3, set/dez., 2001.

LIN, S. J. et al. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Letters to Nature*, v.418, p.344-348, 2002.

LIN, S. J. et al. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH." *Genes & Development*, v. 18, n.1, p. 12-6, 2004.

LIU, Y. et al. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, p. 125–130, 2000.

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, Apr., 2010.

LU, W; YU, P.; LI, J. Induction of apoptosis in human colon carcinoma COLO 205 cells by the recombinant a subunit of C-phycocyanin. *Biotechnol Letters*, p. 2-8, 2010.

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 lifespan 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

MARIANI, D. *Citotoxicidade e função do sistema de defesa antioxidante durante a exposição a cisplatina no modelo Saccharomyces cerevisiae*. 2008. 146 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

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.

MELO, D. M.; DI NUCCI, F.R.C.F.; DOMINGUES, P.C. Imagens cinematográficas da velhice: um enfoque gerontológico. *Revista Kairós*, São Paulo, v.1, n.2, p. 75-90, dez. 2007.

MESQUITA, A et al. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide dismutase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.107, n.34, p. 15123-15128, 2010.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. sirtuins in mammals: insights into their biological. *Biochemical Journal*, v, 404, n. 1, p. 1-13, 2007.

MOREIRA, A. V. B; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutrição*, v. 17, p. 411-424, 2004.

MOTA, M. P.; FIGUEIREDO, P. A; DUARTE, J. A. Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, v. 4, n. 1, p. 81- 110, 2004.

MOTA, S. M. Q. et al. Imunossenescência: alterações imunológicas no idoso. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 67, n. 6, p. 183-188, 2009.

NOVAES, M. R. C. G. et al. Suplementação de micronutrientes na senescência: implicações nos mecanismos imunológicos. *Revista de Nutrição*, v. 18, n. 3, p. 367-376, 2005.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Bioogy*, v.53, n.6, p.1333-1342, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). The world health report. Geneva, 2005.

OUTEIRO, T. F. et al. Sirtuin 2 Inhibitors Resue  $\alpha$ -Synuclein-Mediated Toxicity in *Models of Parkinson's Disease*. *Science*, v. 317, p. 516-519, jul. 2007.

OUTEIRO, T. et al. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1782, n.6, p. 363-369, 2008.

OZDEMIR et al. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research*, v.18, p.754-757, 2004

PINHO, R. A. et al. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.94, n.4, p. 549-555, 2010.

PIPER, P. W. Long-lived yeast as a model for ageing research. *Yeast*, v. 23, n.3, p. 215–226, 2006.

POLJSAK, B. et al. Reproductive Benefit of Oxidative Medicine and Cellular Longevity “Malevolena”? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.1, p.2-9, 2011.

RAJENDRASOZHAN, S. et al. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxidant Redox Signal*, v.10, n.4, p.799-811, 2008.

RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas*, v.40, n.4, p. 495-503, 2004.

REBELATTO, J. R. et al. Antioxidantes, Atividade Física e Estresse Oxidativo em Mulheres Idosas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 14, n. 1, 2008.

REVERTER-BRANCHAT, G. et al. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *The Journal of Biological Chemistry*, v.279, p.31983-31989, 2004.

RIEGEL, R. E. *Radicais Livres*. In: *Bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Editora Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2004, p. 507-536.

RISS, J. et al. Phycobiliprotein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* Is Powerfully Responsible for Reducing Oxidative Stress and NADPH Oxidase Expression Induced by an Atherogenic Diet in Hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 19, p. 7962–7967, 2007.

RIVALDO, E.G. et al. Envelhecimento e saúde bucal. *Stomatos*, v. 14, n. 26, p. 39-45, 2008.

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

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

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

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.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr./jun., 2004.

SHI, Y et al., Comparative studies of oxidative stress and mitochondrial function in aging. *Integrative & Comparative Biology*, v. 50, n. 5, p.869-879, 2010.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B. N., Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, n. 23, p. 10771-10778, 1994.

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

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v.14, n.3, p. 441-445, 2011.

SINCLAIR, D. A.; GUARENTE, L. Extrachromosomal rDNA circles a cause of aging in yeast. *Cell*, v.91, p.1033-1042, 1997.

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

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.

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

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

SOUSA, M. C. M. et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Química Nova*, v.30, n.2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, F. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina em sistemas lipídicos óleos de soja e azeite de oliva. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v.17, n.3, p.275-279, 2006.

THAAKUR, S.; SRAVANTHI, R. Neuroprotective effect of *Spirulina* in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Neural Transmission*, v. 117, n. 9, p. 1083-1091, 2010.

TROTTA, P. A. F. *A inibição do pico da secreção de leptina aos 30 dias reverte as alterações metabólicas em ratos programados pela leptina na lactação*. Tese (Mestrado em Nutrição)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

UNNIKRISHNAN, A.; GAFKEN, P. R.; TSUKIYAMA, T. Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nature Structural e Molecular Biology*, v. 17, n. 4, abr., 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*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. *Revista de Saúde Pública*, v.43, n.3, p. 548-554, 2009.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C.W. *Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, 2000.

WESTPHAL, C. et al. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends in Biochemical Sciences*, v.32, n.12, p.555-560, 2007.

WU, L. C. et al. Antimelanogenic effect of c-phycoerythrin 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.

YAMAMOTO, H. et al. Sirtuin functions in health and disease. *Molecular Endocrinology*, v. 21, n. 8, p.1745-1755. 2007.

YILDIRIM, A. et al. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant response in serum and cerebrospinal fluid in acute ischemic stroke. *Turkey Journal Medicine Science*, v. 37, n. 2, p. 3-7, 2007.

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.

ZADRAG, R.; BARTOS, Z. G.; BILINSKI, T. Is the Yeast a Relevant Model for Aging of Multicellular Organisms? An Insight from the Total Lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Aging Science*, v.1, p. 159-165, 2008.

