

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

**Ficocianina na proteção da toxicidade da alfa-synucleína e deleção do gene SIR2  
em *Saccharomyces cerevisiae***

Luana Taís Hartmann Backes

Passo Fundo

2015

Luana Taís Hartmann Backes

Ficocianina na proteção da toxicidade da alfa-synucleína e deleção do gene SIR2 em  
*Saccharomyces cerevisiae*

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

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

Passo Fundo

2015

CIP – Catalogação na Publicação

---

B126f Backes, Luana Taís Hartmann  
Ficocianina na proteção da toxicidade da alfa-synucleína  
e deleção do gene SIR2 em *Saccharomyces cerevisiae* / Luana  
Taís Hartmann Backes. – 2015.  
142 f. : il., color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) –  
Universidade de Passo Fundo, 2015.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Elita Bertolin.

1. Envelhecimento humano. 2. Doença de Parkinson.  
3. Antioxidantes. 4. Estresse oxidativo. I. Bertolin, Telma  
Elita, orientadora. II. Título.

CDU: 613.98

# ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



**PPGEH**

Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano  
Faculdade de Educação Física e Fisioterapia - FEF

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação:

**"Ficocianina na proteção da toxicidade da alfa-synucleína e deleção do gene *SIR2* em *Saccharomyces cerevisiae*"**

Elaborada por

**LUANA TAÍS HARTMANN BACKES**

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

Aprovada em: 07/04/2015  
Pela Banca Examinadora

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

Profª. Drª. Tatiana Oro  
Coorientadora – Universidade de Passo Fundo – UPF/PPGEH

Profª. Drª. Camilla Pereira Leguiscamo  
Universidade de Passo Fundo – UPF/PPGEH

Profª. Drª. Vanessa Corralo  
Universidade Comunitária de Região de Chapecó - UNOCHAPECÓ

## **DEDICATÓRIA**

Dedico com muito amor e carinho aos meus pais que sempre me apoiaram e estiveram presentes mesmo longe em todas as etapas de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar concluindo esta etapa tão importante em minha vida que é a realização de um sonho, o mestrado.

Agradeço a meus pais, base fundamental em minha vida, pelo apoio durante toda minha trajetória, pelo amor dedicado nesses anos todos. Sou imensamente grata.

Agradeço ao meu noivo, namorado, parceiro, amigo, companheiro de todas as horas, foi a pessoa mais presente nestes dois anos, foi quem presenciou meus dias de vitórias, dias de alegria e também esteve junto nas horas difíceis, sempre me apoiando e caminhando comigo e traçando nossos sonhos.

Agradeço a minha orientadora, professora Telma Elita Bertolin por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir, pelos ensinamentos e amizade ao longo destes dois anos de convívio.

Agradeço a todos os professores do programa de Mestrado em Envelhecimento Humano da Universidade de Passo Fundo pelo conhecimento deixado e pelo carinho e amizade.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Fermentações pela convivência nestes dois anos, e pelo aprendizado, em especial a minha coorientadora Tatiana Oro, que sempre esteve presente em minha trajetória.

As queridas e incansáveis Darqui Thaís Decosta e Marina Migliavacca que tanto me ajudaram na realização prática das análises, todo meu carinho e gratidão, nunca me esquecerei de vocês.

A Ana Cláudia Margarites pelo ensinamento e contribuição neste trabalho.

A querida Rita de Marco pela atenção prestada em todos os momentos.

A minha querida amiga e parceira de bolsa Sheila Cristina Cecagno Zanini pela amizade e por muitas tardes na sala de estudos do PPGEH e trabalhos na Revista Brasileira de Ciência do Envelhecimento Humano.

A minha amiga Fabiola Silva que conheci no mestrado e virou uma grande amizade e parceria que quero levar para vida toda.

Aos colegas de mestrado pelos momentos compartilhados e a amizade que ficará guardada.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram ao longo desse caminho.

## **EPIGRAFE**

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein



## RESUMO

Backes, Luana Taís Hartmann. **Ficocianina na proteção da toxicidade da alfa-synucleína e deleção do gene SIR2 em *Saccharomyces cerevisiae***. 2015. 142 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015.

O aumento dos níveis de estresse oxidativo influencia na doença de Parkinson, que é uma patologia neurodegenerativa, de maior risco no envelhecimento. A formação de agregados da proteína parkinsoniana alfa-synucleína ( $\alpha$ Syn), leva a quadros geradores de toxicidade, evento-chave na progressão da patologia. A necessidade de novas terapêuticas capazes de controlar e prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo torna-se importante e, esta capacidade pode advir do uso de substâncias funcionais naturais. O nosso estudo analisou o efeito protetor da ficocianina, principal pigmento da microalga *Spirulina platensis*, no modelo *Saccharomyces cerevisiae* com expressão para a proteína  $\alpha$ Syn e deleção do gene SIR2 ( $\Delta$ SIR2). O efeito da ficocianina foi analisado através de parâmetros da peroxidação lipídica, atividade enzimática da Catalase, Glutathione e da Superóxido dismutase e também na viabilidade celular, representados por ensaios em triplicatas e avaliados por análise de variância e teste de Tukey. Nossos resultados revelaram que a ficocianina frente à expressão de  $\alpha$ Syn e na deleção do gene SIR2, aumenta de forma significativa a atividade enzimática da CAT, GPX e mantém os níveis de SOD, aumenta a viabilidade celular e diminui os níveis de peroxidação lipídica. A ficocianina nos apresentou ser uma promissora substância funcional para a investigação de novas terapias contra os danos causados pelo estresse oxidativo, nas patologias neurodegenerativas e neste caso em especial, para a prevenção da doença de Parkinson.

Palavras-chave: 1. Antioxidante. 2. Doença de Parkinson. 3. Envelhecimento. 4. Estresse oxidativo. 5. *Spirulina platensis*.

## ABSTRACT

Backes, Luana Taís Hartmann. **Phycocyanin in protection against alpha-synuclein toxicity and deletion of the SIR2 gene in *Saccharomyces cerevisiae***. 2015. 142 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015.

The increase in oxidative stress levels influence the Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder of aging in higher risk. The formation of protein aggregates of alpha-Parkinsonian synucleína ( $\alpha$ Syn) leads to generating frames of toxicity key event in the progression of the disease. The need for new therapies that can control and prevent damage caused by oxidative stress becomes important and this capacity can result from the use of natural functional substances. Our study examined the protective effect of phycocyanin, the main pigment of *Spirulina platensis* in *Saccharomyces cerevisiae* model expression for the  $\alpha$ Syn protein and deletion of SIR2 gene ( $\Delta$ SIR2). The effect of phycocyanin was analyzed by parameters of lipid peroxidation, enzymatic activity of catalase, glutathione and superoxide dismutase and also in cell viability, represented by assays in triplicate and analyzed using ANOVA and Tukey's test. Our results showed that the expression of phycocyanin opposite  $\alpha$ Syn and deletion of SIR2 gene significantly increases the enzymatic activity of CAT and GPX maintains SOD levels, increases cell viability and decreases the levels of lipid peroxidation. The phycocyanin introduced us to be a promising functional substance for the investigation of new therapies against damage caused by oxidative stress in neurodegenerative diseases mainly for prevention of Parkinson's disease.

Key words: 1. Antioxidant. 2. Parkinson's disease. 3. Elderly. 4. Oxidative stress. 5. *Spirulina platensis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Peroxidação lipídica frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2.....	33
Figura 2 - Dosagem enzimática da CAT frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2.....	35
Figura 3 - Dosagem da atividade da GPX frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2.....	37
Figura 4 - Dosagem enzimática da SOD frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2.....	38
Figura 5 - Determinação da viabilidade celular por PI frente à toxicidade de alfa-synucleína e deleção do gene SIR2.....	40

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\alpha$ Syn	Alfa-synucleína
SIR2	Sirtuína 2
$\Delta$ SIR2	Deleção do gene sirtuína 2
SOD	Enzima Superóxido dismutase
CAT	Enzima Catalase
GSH	Enzima Glutathiona Reduzida
GR	Enzima Glutathiona Redutase
GPX	Enzima Glutathiona Peroxidase
YPD	Yeast Peptone Dextrose
SC-ura RAF	Meio de cultivo completo sintético sem uracil com Rafinose
SC-ura GAL	Meio de cultivo completo sintético sem uracil com Galactose
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TFK	Tampão Fosfato de Potássio
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
RL	Radicais livres
RPM	Rotação por Minuto
Nm	Nanômetros
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
PI	Iodeto de Propídio
MFI	Intensidade média de fluorescência

GRAS	Certificado Geralmente Reconhecido como Seguro
EROS	Espécies reativas de oxigênio
MI	Mililitros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA I</b>	<b>23</b>
2.1	<i>Introdução</i>	24
2.2	<i>Metodologia</i>	26
2.2.1	Modelo experimental	26
2.2.2	Condições de crescimento da levedura	26
2.2.3	Preparação do extrato proteico ficocianina e aplicação do tratamento nas células	28
2.2.4	Avaliação da peroxidação lipídica pelo método TBARS	28
2.2.5	Dosagem da atividade enzimática da superóxido desmutase (SOD)	29
2.2.6	Dosagem da atividade enzimática da catalase (CAT)	30
2.2.7	Dosagem da atividade enzimática da glutatona (GPX)	31
2.2.8	Viabilidade celular	32
2.2.9	Metodologia analítica	32
2.3	<i>Resultados</i>	32
2.4	<i>Discussão</i>	41
2.5	<i>Conclusão</i>	47
2.6	<i>Referências</i>	47
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>70</b>
Anexo A.	<i>Comprovante de submissão</i>	71
	<b>APÊNDICES</b>	<b>73</b>
Apêndice A.	<i>Projeto de pesquisa</i>	74

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um fenômeno de amplitude global e na atualidade se observa notável crescimento da população idosa em relação aos demais grupos etários. A porcentagem da população idosa no mundo tem demonstrado um significativo aumento, e a perspectiva para 2050 é que 22% da população mundial sejam composta por idosos, onde os idosos com 80 ou mais anos representará o grupo etário de maior crescimento no mundo (NOALE et al., 2012; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

Dentre as assertivas hipóteses abordadas nas teorias do envelhecimento, verifica-se a influência do processo oxidativo no envelhecimento celular. Este processo foi descrito por Harman em 1956, em que propunha que o envelhecimento estava associado a moléculas produzidas pelo metabolismo oxidativo, denominadas radicais livres. De acordo com o autor, o fenômeno de envelhecimento é o resultado do acúmulo de lesões moleculares provocadas pelas reações dos radicais livres nos componentes celulares ao longo da vida, que conduzem à perda de funcionalidade celular e à doenças relacionadas com o aumento da idade, conduzindo à morte (HARMAN, 1988; RISTOW; SCHMEISSER, 2011).

Neste contexto, o envelhecimento é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (OUTEIRO et al., 2007). Os danos causados pelo estresse oxidativo tem sido investigados por diferentes autores e as respostas desses estudos evidenciam fortes relações com as doenças neurodegenerativas (KUMAR et al., 2012; OUTEIRO et al. 2009; RISTOW; SCHMEISSER, 2011). Sabe-se que a base molecular destes mecanismos precisa ainda ser desvendada a fim de garantir o desenvolvimento de novas terapêuticas explorando conhecimentos que desvendem as patologias associadas à idade, com ênfase a doença de Alzheimer e doença de Parkinson (KOURTIS;

---

TAVERNARAKIS, 2011; MACEDO et al., 2014; OUTEIRO et al., 2009; YU; CHUNG, 2006).

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa, que acomete cada 150 a 200 indivíduos de 100.000 habitantes por ano, na população mundial (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011). Esta doença se manifesta principalmente em pacientes idosos, e tem maior prevalência na América do Norte e Europa (MUSGROVE; KING; DICKSON, 2012; BACKES; SCORTEGAGNA; BERTOLIN, 2013; DICKSON, 2012; FREITAS; MAGALHÃES, 2011; MOTA; FIGUEIREDO; DUARTE, 2004).

A doença de Parkinson leva à disfunção e a perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos presentes na substância nigra do cérebro. Essa é responsável pela secreção do hormônio dopamina nos gânglios da base e controlam e ajustam a transmissão dos comandos conscientes vindos do córtex cerebral para os músculos do corpo humano (FELLNER; STEFANOVA, 2012). Os neurônios dopaminérgicos e outras estruturas produtoras de serotonina, noradrenalina e acetilcolina estão envolvidos na gênese das doenças neurodegenerativas (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011; IMAI; LU, 2011; KUMAR et al., 2012; MARQUES; OUTEIRO, 2012; TOFARIS, 2012; VENDEROVA; PARK, 2012; TREDICI; BRAAK, 2012).

A origem da doença de Parkinson está relacionada ao estresse oxidativo, um fenômeno resultante da exposição e acúmulo de toxinas geradas por fatores extrínsecos e intrínsecos sejam esses, fatores ambientais, fatores de radiação, agrotóxicos, agentes químicos e tóxicos, poluentes, tabagismo, alcoolismo, dieta desequilibrada, processos inflamatórios dentre outros (COUNE et al., 2013; HARMAN, 1988; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010; VENDEROVA; PARK, 2012; VIVES-BAUZA; PRZEDBORSKI, 2011). Essa patologia caracteriza-se diretamente pelo acúmulo e a agregação da proteína alfa-sinucleína, que representa a molécula-chave responsável pela toxicidade neuronal e o agravamento da patologia (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013;



---

KLEIN; WESTENBERGER, 2012; MARQUES; OUTEIRO, 2012; POLYMEROPOULOS et al., 1997; TERAOKA et al., 2012).

A alfa-sinucleína é uma proteína composta por 140 aminoácidos com um peso molecular aproximado de 14 kDa e possui estrutura helicoidal desdobrada, que está presente nos terminais pré-sinápticos não amilóides apresentando uma localização nuclear (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013; MARQUES; OUTEIRO, 2012; SOPER et al., 2011). O conteúdo dopaminérgico é transportado até o axônio ao longo de microtúbulos em direção à periferia da célula. Em condições patológicas, a alfa-sinucleína se acumula em oligômeros e agregados que leva à disfunção do transporte axonal, ocorrendo assim à diminuição da liberação de neurotransmissores, gerando quadros de toxicidade e, conseqüentemente agravando o processo degenerativo. Estes eventos são fatores de risco para o desenvolvimento da doença de Parkinson (EISBACH; OUTEIRO, 2013; OUTEIRO et al., 2009; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012).

Recentes estudos apontam que as alterações e modificações causadas pela toxicidade de alfa-sinucleína no cérebro de pacientes afetados pela doença de Parkinson e outras alfa-sinucleopatias, tem sido indicadas pelo acúmulo de inclusões nos corpos de Lewy que contém substâncias fosforiladas, causadas pelo estresse oxidativo (OUTEIRO et al., 2009; XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2012; XUAN et al., 2011).

Os Corpos de Lewy possuem como componente primário a alfa-sinucleína. Estes são estruturas celulares presentes nos neurônios afetados devido à diminuição do hormônio dopamina (TREDICI; BRAAK, 2012; WAN; CHUNG, 2012). Quando presentes nos neurônios sobreviventes, os corpos de lewy levantam a idéia de que o menor peso molecular da proteína alfa-sinucleína pode constituir as espécies tóxicas (MARQUES; OUTEIRO, 2012; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012; BEYER; ARIZA, 2012; DETTMER et al., 2013; EISBACH; OUTEIRO, 2013; PACHECO; AGUAYO; OPAZO, 2012; WITT, 2012). A toxicidade causada pelas inclusões de alfa-sinucleína

---

ainda não está bem esclarecida. As investigações buscam entender a relação entre o transporte axonal e à integração de resqúícios neurais junto às membranas receptoras (EISBACH; OUTEIRO, 2013), no entanto sabe-se que esta toxicidade promove um processo de agregação ou a formação de inclusões agravando as patologias neurodegenerativas (OUTEIRO et al., 2009).

O cérebro, por utilizar grandes concentrações de oxigênio para manutenção e equilíbrio dos sistemas, é vulnerável ao estresse oxidativo, contribuindo de forma enfática para o desenvolvimento de patologias decorrentes do envelhecimento, daí a sua grande vulnerabilidade aos agentes produtores de radicais livres (RL) (COUNE et al., 2013; KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011; MARQUES; OUTEIRO, 2012; RISTOW; SCHMEISSER, 2011; TERAOKA et al., 2012; YU; CHUNG, 2006).

A modulação do estresse oxidativo nas células pode ter também relação com o gene SIR2. Segundo Outeiro e seus colaboradores (2007) a deleção do gene SIR2 em células neuronais humanas pode fornecer um caminho para intervenção na doença de Parkinson, através da diminuição do acúmulo de alfa-sinucleína nas estruturas dos corpos de Lewy, evitando a perda de neurônios dopaminérgicos e protegendo da morte celular. No entanto, de acordo com diferentes autores, estas respostas necessitam de maiores investigações a fim de desvendar o paradoxo das suas propriedades neuroprotetoras (GUARIENTE et al., 2010; KUMAR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; OUTEIRO et al., 2007; SAMPAIO-MARQUES, et al., 2012; SINCLAIR et al., 1997; YU; CHUNG, 2006).

Os antioxidantes são substâncias moleculares que neutralizam radicais livres, aceitando ou doando elétrons para eliminar a condição desemparelhada do radical. Mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, os antioxidantes tem o poder de inibir as taxas de oxidação, impedindo o ataque das espécies reativas de oxigênio sobre os lipídeos, aminoácidos e as bases do DNA, evitando a perda da integridade celular (LÜ et al., 2010; MACEDO et al., 2014).

---

Para a manutenção dos processos oxidativos que afetam o organismo, existem as defesas antioxidantes naturais, incluindo enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GSH) e glutathione peroxidase (GPX) (RISTOW; SCHMEISSER, 2011). Sabe-se que, se os radicais primários não forem desativados imediatamente pelas enzimas endógenas ou moléculas antioxidantes, surgirão danos biológicos nas macromoléculas. Este acúmulo de danos, com o passar da idade nas células e tecidos, é resultante do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, ou de uma diminuição da capacidade antioxidante e na velocidade de remoção e reparação das mesmas, caracterizando o estresse oxidativo (HARMAN, 1988; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010; KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011; KUMAR et al., 2012).

Alguns compostos antioxidantes podem ser capazes de proteger as células neuronais por meio da eliminação dos radicais livres e ativação dos mecanismos de defesa antioxidantes (MACEDO et al., 2014; MARQUES; OUTEIRO, 2012; VENDEROVA; PARK, 2012). Além disso, a terapêutica de associação, com os antioxidantes e os fármacos específicos pode ser benéfica e melhorar a eficácia da terapia padrão para o tratamento de doenças neurodegenerativas (ARON; TSVETKOV; FINKBEINER, 2013; COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011).

A cura para a doença de Parkinson ainda não é conhecida pela ciência. A busca de terapias a base de antioxidante poderia ser capaz de controlar a taxa de progressão e corrigir alterações de aspectos múltiplos da doença (MACEDO et al., 2014; YASUDA; NAKATA; MOCHIZUKI, 2012). Para tanto, é de extrema urgência e necessidade a descoberta de novas estratégias de intervenções terapêuticas a partir de fontes antioxidantes naturais que tenham propriedades benéficas e ações protetivas capazes de controlar o ataque dos radicais livres e auxiliar a modulação das enzimas antioxidantes contra os danos causados pelo estresse oxidativo (BERMEJO et al., 2008; MACEDO et al., 2014; PABÓN, 2011; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012).

---

Neste sentido, surgiu o interesse científico em analisar o potencial antioxidante de uma substância natural, a ficocianina, uma ficobiliproteína presente na cianobactéria *Spirulina platensis*, frente à manutenção dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo no modelo *Saccharomyces cerevisiae*.

As cianobactérias são microalgas fotossintetizantes (BACHSTETTER et al., 2010; CHEONG et al., 2010) e possuem específicos pigmentos, dentre eles, carotenoides, clorofila e biliproteínas, os quais conferem diferentes propriedades funcionais (BOUSSIBA; RICHMOND, 1979; CHEONG et al., 2010). A *Spirulina platensis* possui ficobilissomas, pigmentos de complexo proteicos, compostos principalmente por polipeptídeos chamados ficobiliproteínas. As duas ficobiliproteínas mais importantes presentes nesta microalga são a ficocianina e aloficocianina, com atividade antioxidante, sendo que a ficocianina, é o principal componente do extrato aquoso da *Spirulina platensis* (BERMEJO et al., 2008; BHAT; MADYASTHA, 2000; MIRANDA et al, 1998).

Na atualidade, a *Spirulina platensis* está ganhando mais atenção por suas propriedades medicinais e nutricionais (ZHOU et al., 2013). Em muitos países, é usada como suplemento na alimentação e na farmacologia, devido ao seu potencial nutracêutico, anti-inflamatório e antibacteriano (BERTOLIN et al., 2009; COLLA; BAISH; COSTA, 2008; COSTA et al., 2005).

Recentes estudos apontam que a ficocianina pode ser um anti-estressor do sistema nervoso, pois atua diminuindo a patogenicidade de doenças neurodegenerativas ativando a microglia, além de prevenir as infecções virais (GUARIENTI et al., 2010; ZHOU et al., 2013). Para tal, a ficocianina apresenta-se como estimulante do sistema imunológico (CHEONG et al., 2010). Estudos realizados por Bermejo et al. (2008), sugerem que a ficocianina, é um potente destruidor de radicais livres, devido a sua capacidade quelante e inibitória sobre a peroxidação lipídica micro-somal, e pode ter

---

papel antioxidante importante na atividade neuroprotetora, porém, ainda não se tem exata comprovação deste potencial.

Em nosso estudo, a ficocianina foi analisada quanto à capacidade antioxidante de proteção frente à toxicidade de alfa-synucleína e sob a deleção do gene SIR2 *in vitro*, utilizando o modelo levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que representa um dos mais importantes modelos experimentais usados em pesquisas para compreender a biologia básica do envelhecimento (MANNARINO et al., 2010; OUTEIRO et al., 2007; TENREIRO et al., 2013). As leveduras são microrganismos unicelulares, eucarióticos, se reproduzem por divisões mitóticas ou por reprodução sexuada (KAEBERLEIN, 2010; RALSER; MICHEL; BREITENBACH, 2012). Em comparação com outros sistemas, ela permite quantificar a longevidade e avaliar a atividade antioxidante de compostos de forma rápida, econômica e reprodutível, devido seu fenômeno de brotamento, isto se dá devido ao fácil cultivo, além de curto tempo de geração quando comparado com as células animais (DENG; CHOW, 2011; MANNARINO et al., 2010; KAEBERLEIN, 2010; KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011; OUTEIRO et al., 2009; TENREIRO; OUTEIRO, 2010) .

Apesar da diferença fisiológica entre a levedura e o ser humano, o estudo por meio deste modelo experimental tem proporcionado as introspecções chave abrindo caminhos que modulam o envelhecimento patológico no ser humano, principalmente devido a sua capacidade de proporcionar facilidade na obtenção de mutações genéticas e moleculares, devido ao conhecimento de seu genoma (TENREIRO; OUTEIRO, 2010).

Alguns estudos afirmam que *Saccharomyces cerevisiae* é um poderoso modelo na elucidação de aspectos moleculares associados ao efeito citotóxico da alfa-synucleína, por possuir mecanismos de envelhecimento (SAMPAIO-MARQUES et al. 2012). Neste sentido, é viável mutações genéticas para expressão de alfa-synucleína, acentuando os níveis de estresse oxidativo nas próprias células da levedura, tornando-a um modelo estressor, induzido pela toxicidade (EISBACH; OUTEIRO, 2013). Desta

---

forma, torna-se possível a quantificação dos níveis de proteção da ficocianina contra a citotoxicidade de alfa-synucleína (MANNARINO et al., 2010). Recentes estudos a partir do modelo levedura mostram que quando ocorre a mutação para expressão alfa-synucleína em *Saccharomyces cerevisiae*, esta expressão se dá na membrana plasmática e forma inclusões. A expressão de alfa-synucleína em leveduras também foi mostrada para inibir o crescimento, provocar o acúmulo de gotículas lipídicas, alterar tráfego de vesículas e o aumento de espécies reativas de oxigênio (OUTEIRO; LINDQUIST, 2003; HOWITZ et al., 2003; KAEBERLEIN, 2010; MANNARINO et al., 2010, TENREIRO et al., 2013).

É possível também a partir do modelo levedura, mutações como a deleção do gene SIR2, o que a torna um modelo homólogo e fidedigno ao ser humano (SIR1) na representação das doenças neurodegenerativas (BÜTTNER et al., 2010; RALSER; MICHEL; BREITENBACH, 2012; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012; SINCLAIR et al., 1997). O gene SIR2 pode representar um forte alvo para terapias onde a agregação de proteínas é dominante na patogênese da doença de Parkinson (JADIYA et al., 2011; LORES-ARNAIZ; BUSTAMANTE, 2011; OLIVEIRA et al., 2012). A modulação das sirtuínas pode ser um caminho para mimetizar os efeitos do envelhecimento, que é causador de patologias neurodegenerativas decorrentes dos danos causados pelo estresse oxidativo (ALBANI et al., 2009; OUTEIRO; MARQUES; KAZANTSEV, 2008; WEBSTER et al., 2012; PAIS et al., 2013).

O nosso objetivo foi avaliar efeito protetor da ficocianina frente à toxicidade causada pela expressão da proteína alfa-synucleína e a deleção do gene SIR2 em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, através da análise da peroxidação lipídica, da viabilidade celular e da medida da atividade de enzimas antioxidantes endógenas SOD, CAT e da GPX.

## 2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA I

### FICOCIANINA NA PROTEÇÃO DA TOXICIDADE DA ALFA-SYNUCLEÍNA E DELEÇÃO DO GENE SIR2 EM *Saccharomyces Cerevisiae*

Luana Taís Hartmann Backes<sup>1</sup>, Tatiana Oro<sup>1</sup>, Telma Elita Bertolin<sup>1</sup>

Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil.

#### Resumo

O estresse oxidativo pode caracterizar um fator preponderante na modulação da doença de Parkinson (DP), uma patologia neurodegenerativa de risco aumentado no processo do envelhecimento humano. A partir da formação de agregados da proteína alfa-synucleína ( $\alpha$ Syn), evento-chave para progressão da DP, quadros de estresse oxidativo e de toxicidade são gerados. A investigação de substâncias funcionais naturais que possam controlar e prevenir esses danos torna-se importante. Neste estudo, investigamos o efeito protetor da ficocianina, pigmento da cianobactéria *Spirulina platensis*, no modelo *Saccharomyces cerevisiae* com expressão para a proteína alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2 ( $\Delta$ SIR2). Para tal, analisamos os parâmetros de peroxidação lipídica (TBARS), atividade das enzimas SOD, CAT, GPX e viabilidade celular. Nossos resultados revelaram que a ficocianina, frente à expressão da alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2, aumenta de forma estatisticamente significativa os níveis de SOD, CAT e da GPX e também aumenta a viabilidade celular e atenua de forma estatisticamente significativa os níveis de peroxidação lipídica. Esses resultados foram ainda mais expressivos frente à deleção do gene SIR2. A ficocianina mostrou ser uma promissora substância funcional para a investigação de novas terapias contra os

---

danos causados pelo estresse oxidativo nas patologias neurodegenerativas e nesse caso de estudo para a doença de Parkinson.

Palavras-chave: *Antioxidante, Doença de Parkinson, Envelhecimento, Estresse oxidativo, Spirulina platensis.*

#### Abstract

Oxidative stress can characterize a major factor in the modulation of Parkinson's disease (PD), an increased risk neurodegenerative disease in the human aging process. From the formation alpha-synuclein protein ( $\alpha$ Syn) aggregates, a key event for periodontal disease progression, conditions of oxidative stress and toxicity are generated. An investigation of functional natural substances that can control and prevent the damage becomes important. In this study, the protective effect of phycocyanin, a cyanobacterium *Spirulina platensis* pigment, in the *Saccharomyces cerevisiae* model with expression for the protein ( $\alpha$ Syn) and deletion of SIR2 gene ( $\Delta$ SIR2) were investigated. To accomplish this, lipid peroxidation parameters (TBARS), activity of SOD, CAT and GSH enzymes and cell viability were analyzed. The results showed that against the expression of alpha-synuclein and deletion of the SIR2 gene, phycocyanin increased the levels of SOD, CAT and GPX and the cell viability, and attenuates the levels of lipid peroxidation in a statistically significant form. Phycocyanin proved to be a promising functional substance in the investigation of new therapies against the damage caused by oxidative stress in neurodegenerative diseases in this case of study on Parkinson's disease.



---

## 2.1 Introdução

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa com risco aumentado no processo do envelhecimento humano. Apesar dos estudos intensivos sobre a base molecular dessa doença, ainda não se tem uma compreensão abrangente de todos os mecanismos subjacentes à mesma, comprometendo o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013; KLEIN; WESTENBERGER, 2012; OUTEIRO et al., 2009). A doença de Parkinson e outras sinucleinopatias se caracterizam pelo acúmulo e a agregação da proteína alfa-sinucleína, uma proteína pré-sináptica, a qual parece ser a molécula-chave responsável pela toxicidade neuronal e o consequente agravo da patogenia (MARQUES; OUTEIRO, 2012; OUTEIRO et al., 2009).

A formação de agregados de alfa-sinucleína é modulada por estímulos internos e externos, e tem forte relação com o aumento dos níveis de estresse oxidativo (BEYER; ARIZA, 2012; DETTMER et al., 2013; EISBACH; OUTEIRO, 2013; POLYMEROPOULOS et al., 1997; TERAOKA et al., 2012). A alfa-sinucleína é susceptível a modificações oxidativas induzidas pelos radicais livres (PACHECO; AGUAYO; OPAZO, 2012; WITT, 2012). Estas alterações e modificações causadas pela toxicidade de alfa-sinucleína no cérebro de pacientes afetados pela doença de Parkinson têm sido relacionadas pelo acúmulo de inclusões dos corpos de Lewy, fazendo relação ao estresse oxidativo (OUTEIRO et al., 2008; OUTEIRO et al., 2009; XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2012; XUAN et al., 2011).

Diante deste contexto, diferentes autores sugerem que a modulação do estresse oxidativo nas células pode também ter relação com o gene SIR2. Segundo Outeiro e seus colaboradores (2007) a deleção do gene SIR2 em células neuronais humanas pode fornecer um caminho para intervenção na doença de Parkinson, através da diminuição do acúmulo de alfa-sinucleína nas estruturas dos corpos de Lewy, evitando a perda de neurônios dopaminérgicos e protegendo da morte celular. Para isto se faz necessário

---

maiores estudos sobre a SIR2 a fim de elucidar seu efeito sobre as doenças neurodegenerativas e desvendar o paradoxo das suas propriedades neuroprotetoras (OUTEIRO et al., 2009; OUTEIRO; LINDQUIST, 2003; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012).

A investigação e identificação de novas estratégias de intervenção terapêutica que possam controlar os danos causados pelo estresse oxidativo, são muito importantes, e podem advir do uso de substâncias naturais com potencial antioxidante (BERMEJO et al., 2008; MACEDO et al., 2014). Neste estudo, verificamos a utilização da ficocianina, quanto à capacidade de proteção frente à toxicidade da alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2. Para tal, realizamos as análises de peroxidação lipídica, viabilidade celular e atividade das enzimas antioxidantes endógenas SOD, CAT e a GPX, no modelo *Saccharomyces cerevisiae* transformado a nível genético.

A ficocianina é uma ficobiliproteína, de cor azul ciano, solúvel em água caracterizada como o principal componente do extrato aquoso da cianobactéria *Spirulina platensis* (COSTA et al., 2005). A *Spirulina platensis* representa um microrganismo fotossintetizante que habita águas alcalinas, salobras, marinhas e doces (BACHSTETTER et al., 2010; CHEONG et al., 2010). Esta microalga é legalmente autorizada como complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo FDA, que recentemente, emitiu o primeiro certificado Generally Recognized as Safe (GRAS) para a *Spirulina platensis* deliberando o seu uso como alimento, sem apresentar risco à saúde (COLLA; BAISH; COSTA, 2008; DENG; CHOW, 2010). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconheceu a *Spirulina platensis* como composto possível de ser utilizado nas formulações de alimentos (ANVISA, 2009; ZHOU et al., 2013). E o seu pigmento ficocianina, atualmente vem sendo apresentado com potenciais terapêuticos importantes, como na ação anticolesterolêmica (BERTOLIN et al., 2009; CHEONG et al., 2010), propriedades antiinflamatórias e antibacterianas (CHEONG et al., 2010), capacidades funcionais antioxidantes

---

(BERMEJO-BESCÓS; PIÑERO-ESTRADA; FRESNO, 2008; PABÓN, 2011), estimulante do sistema imunológico (DENG; CHOW, 2010).

Sendo o interesse deste estudo em relação ao uso da ficocianina objetiva poder corroborar com os achados dos referidos autores e também elucidar as possíveis capacidades funcionais da ficocianina frente à doença de Parkinson e de outras sinucleinopatias, utilizando o modelo *Saccharomyces cerevisiae*, transformado geneticamente para a expressão da proteína alfa-synucleína e para a deleção do gene SIR2.

## 2.2 Metodologia

### 2.2.1 Modelo experimental

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como modelo experimental, a partir das linhagens BY4741-025 (EMPTY) (cepa controle), BY4741-140 (EMPTY- $\alpha$ Syn) (cepa controle com expressão para alfa-synucleína), SIR2-025 ( $\Delta$ SIR2) (cepa com deleção ao gene SIR2), SIR2-140 ( $\Delta$ SIR2- $\alpha$ Syn) (cepa com deleção ao gene SIR2 e expressão para alfa-synucleína), provenientes do Instituto de Medicina Molecular – Laboratório de Neurociências da Universidade de Lisboa, Portugal.

### 2.2.2 Condições de crescimento da levedura

As células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram mantidas em placas de Petry com meio de cultivo Yeast Peptone Dextrose (YPD) sólido, sob refrigeração a 4 °C. Para a condução dos cultivos experimentais, as células foram submetidas a 3 etapas de cultivo: Pré-inóculo, inóculo e indução. Para o pré-inóculo, as amostras foram cultivadas em tubos do tipo Fálcon de 15 mL contendo 20 % do seu volume preenchido por meio SC-ura RAF 1% durante 24 horas. Após as 24 horas realizou-se a leitura da densidade óptica em 600nm ( $DO_{600nm}$ ) onde esperava-se uma absorbância em torno de

---

( $DO_{600nm}$ ) 0,8 Abs. Da mesma maneira seguiu o processo de inóculo. E após 24 horas, foi realizado o processo de indução, etapa onde ocorre a expressão da toxicidade de alfa-synucleína nas células. As amostras foram induzidas em tubos do tipo Fálcon de 50 mL contendo 10 mL de meio SC-ura GAL, com e sem tratamento de ficocianina, cultivadas a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, por um período de 16 horas (MACEDO et al., 2014). É neste momento que ocorre a indução do estresse oxidativo nas células, através da expressão da proteína alfa-synucleína contida no DNA das células que passam a gerar quadros de toxicidade, tornando nosso modelo estressor, sem a necessidade da aplicação de elementos químicos. Após este período, realizou-se a leitura da densidade óptica em 600nm ( $DO_{600nm}$ ) onde esperava-se uma absorbância em torno de ( $DO_{600nm}$ ) 0,2 Abs.

Neste processo é também aplicado o tratamento da substância em estudo, a ficocianina. As células com tratamento de ficocianina foram induzidas em 10 mL de meio SC-ura GAL. A ficocinina foi adicionada a esse meio para atingir a concentração de 48 mg/mL, concentração estabelecida em estudos anteriores. Os cultivos sem tratamento foram realizados nas mesmas condições, porém na ausência de ficocianina.

### 2.2.3 Preparação do extrato proteico de ficocianina e aplicação do tratamento nas células

A ficocianina, extrato aquoso da *Spirulina platensis*, purificada e concentrada, proveniente da Companhia de Parry Nutraceuticals Division - EID Parry (Índia), foi adicionada ao meio SC-ura GAL. Para tal, preparamos uma solução com concentração final de 48 mg/mL. Esta concentração, foi escolhida visto os testes de toxicidade da ficocianina, realizados como ensaios preliminares, pelo nosso grupo de pesquisadores junto ao IMM – Lisboa, que demonstram maior potencial antioxidante nesta dosagem.

Em capela de fluxo laminar foi realizado o processo de filtração e esterilização do extrato de ficocianina para a posterior utilização nos meios de cultivo com

---

*Saccharomyces cerevisiae*. O processo foi realizado através do uso de filtros de seringa do tipo Minisart RC20 com membranas hidrofílicas de celulose de 0,2  $\mu\text{M}$ .

#### 2.2.4 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de TBARS

Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é a análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esse método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica que, ao reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MANNARINO et al., 2010). Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 532nm (NETO et al., 2008). Inicialmente, foram recolhidas por centrifugação 50 mg de células com e sem tratamento de ficocianina. As células foram lavadas duas vezes com água destilada gelada, ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de TCA 10% (ácido tricloro acético) e transferidas para tubo do tipo fálcon. Foram adicionadas 1,5 g de pérolas de vidro para que ocorresse a lise celular, sob agitação vigorosa de 6 ciclos de 20 s no vórtex e 6 ciclos alternados de 20 s no gelo, sucessivamente. O extrato foi recolhido em micro tubo, as pérolas de vidro foram lavadas com 500  $\mu\text{L}$  de TCA 10% e centrifugadas a 4000 rpm por um período de 4 minutos, obtendo-se o sobrenadante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Com a execução deste procedimento obtivemos a quantidade de 0,3 ml de amostra. A essa amostra adicionamos 0,6 ml do ácido tiobarbitúrico (TBA 1%), 0,1 ml de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) obtendo um volume total de 1 mL de reação para cada amostra. Na sequência, a mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 minutos. Os tubos foram então resfriados e a absorbância medida espectrofotometricamente a 532 nm. O cálculo da concentração de TBARS foi realizado a partir da construção de uma curva-padrão de tetraetoxipropano. Os resultados foram expressos em nmol MDA/mL<sup>-1</sup> de células. Os níveis destas substâncias são utilizados como marcadores da peroxidação lipídica nos estados de estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; YILDIRIM et al., 2007).

---

### 2.2.5 Dosagem da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), pelo método de detecção de adrenalina-citocromo

O método utilizado para a determinação da atividade da SOD, baseia-se na da medida da velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM, pH 10) e adrenalina (1 mM). Para tal, 3 ml do cultivo foi submetido a duas lavagens com tampão fosfato de sódio, pH 7,0 (0,5 ml) a 6000 rpm durante 5 minutos. Após este procedimento, acrescentamos 1,5 g de pérolas de vidro e 0,5 mL do tampão fosfato para o processo de lise celular, em 3 ciclos sucessivos com duração de 1 minuto, de agitação em vórtex e banho de gelo. Logo após estas etapas o material foi centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em tubos de ensaio para as posteriores dosagens. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e estes em triplicatas. Para zerar o equipamento utilizamos tampão glicina. As dosagens foram realizadas a partir de três diferentes quantidades de amostras, 20, 40 e 60  $\mu\text{L}$ . Após, adicionamos 17  $\mu\text{L}$  de adrenalinae então a leitura. A partir do gráfico, foi calculado quantos  $\mu\text{L}$  correspondem à inibição de 50 %, sendo que a unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de formação do adencromo (BOVERIS et al., 1983; MCCORD; FRIDOVICH; 1969; NELSON; COX, 2005). Os resultados foram expressos em unidades de SOD por mg de proteína.

### 2.2.6 Dosagem da atividade enzimática da catalase (CAT) pelo método de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

A catalase, enzima intracelular encontrada na maioria dos organismos decompõe o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (NELSON; KIESOW, 1972). A decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase pode ser acompanhada pelo decréscimo da absorbância em 240 nm, onde a diferença da absorbância (240) por unidade de tempo é usada para medir a atividade da catalase. A preparação da amostra iniciava-se com a

---

adição de 2000  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (TFK) 50 mM pH 7,0, para zerar o equipamento. Posteriormente, a cubeta era retirada do equipamento, lavada com água destilada e colocada novamente no espectrofotômetro. Em seguida acrescentamos 1910  $\mu\text{L}$  de tampão TFK 50 mM pH 7,0 e adicionamos 20  $\mu\text{L}$  da amostra diluída. Na sequência pipetamos 70  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a cubeta (NELSON; KIESOW, 1972). A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o peróxido de hidrogênio é reduzido pela ação da enzima, provocando diminuição no valor da absorbância em 240nm. A diferença na leitura das absorbâncias a 240nm, em determinado intervalo de tempo (15 segundos), permite estabelecer a velocidade de redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que é proporcional a velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  (NELSON; KIESOW, 1972). O cálculo da atividade da CAT foi frelaizado pelo uso da equação:  $(2,3/\Delta t) (a/b) \cdot (\log a_1/a_2)$ , onde  $\Delta t$  é a variação do tempo de reação (15s), a é o volume de hemolisado na cubeta, b é a concentração da amostra em g/dL,  $a_1$  é o valor da absorbância no tempo zero ( $t = 0$ ) e  $a_2$  é o valor da absorbância no tempo final ( $t = 15\text{s}$ ). A unidade final foi em ml/mg/min.

#### 2.2.7 Dosagem da atividade enzimática da glutathione (GPX) por DTNB

A análise de dosagem da atividade enzimática da glutathione GPX é um processo enzimático sensível e específico. A glutathione é oxidada pelo ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB). A glutathione oxidada é reduzida pela taxa de formação de TNB e sua absorbância é lida em 412 nm, sendo proporcional a soma da GSH e da GSSG presentes. A glutathione desempenha um papel importante no processo metabólico da detoxificação eletrofílica sendo considerado um fiável índice de estressores oxidativos (ANDERSON, 1985; CLARKE, 1997; VANDEPUTTE, 1994).

Inicialmente foi pipetado uma quantidade equivalente a 2 ml da amostra em tubos de parede grossa e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. Após foi retirado o sobrenadante e adicionado 1,3 mL de TCA 10% (ácido tri-cloro acético) para reagir e novamente centrifugado á 2000 rpm por 20 minutos e então retriámos o sobrenadante.

---

---

Na sequência o sobrenadante foi acrescido de 130  $\mu\text{L}$  de DTNB e homogeneizado. A leitura foi realizada em 412 nm. O cálculo final das amostras foi obtido a partir da construção de uma curva padrão com Cisteína 0,5 mM, TFK 0,05 M pH 6,8, DTNB 10 mM e  $\text{H}_2\text{O}$ . O resultado final está expresso em nmol/mg de proteína.

#### 2.2.8 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através da citometria de fluxo, realizada no equipamento FACSBDSLRS Fortessa, equipado com o BP 695/40 e a 685 LP. Para analisar a viabilidade celular, as células de levedura foram incubadas com 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de iodeto de propídio (PI), durante 30 minutos ao abrigo da luz. Foi analisado o comprometimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com e sem o tratamento de ficocianina. A análise dos dados foi realizada utilizando software FlowJo e a exclusão de doublets celulares com base em parâmetros de dispersão -W Forward-A. Os resultados foram expressos como MFI (intensidade média de fluorescência) de uma molécula (OWUSU-ANSAH; YAVARI; BANERJEE, 2008).

#### 2.2.9 Análise estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram representados como a média  $\pm$  DP de pelo menos três triplicatas, e então avaliados por análise de variância ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa PASW Statistics 18.0.

### 2.3 Resultados

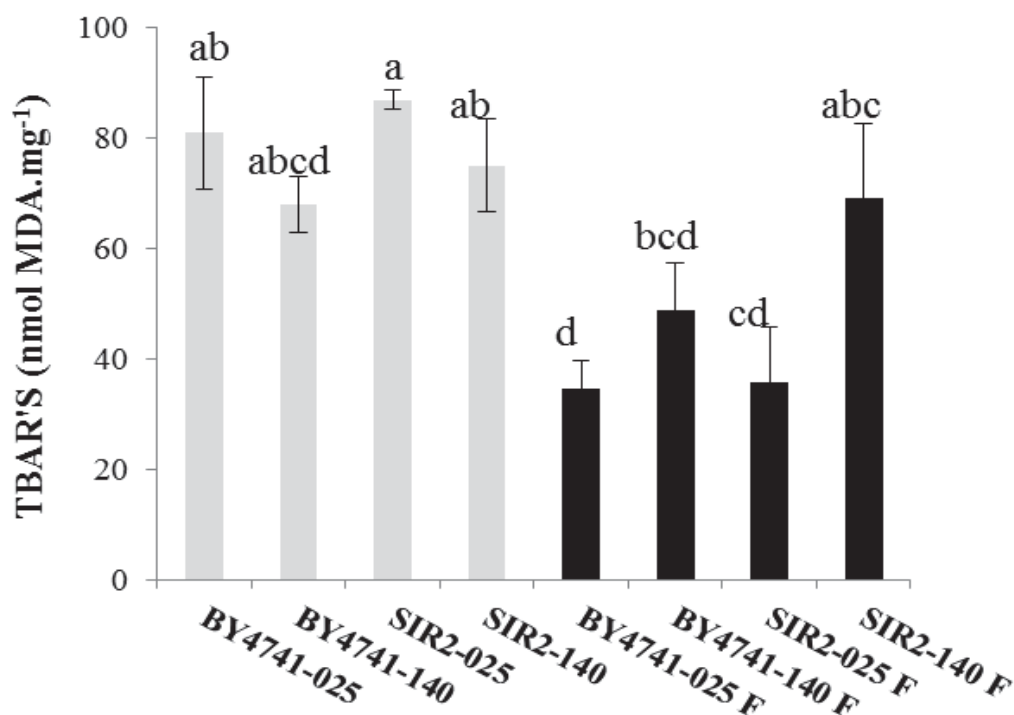
#### 2.3.1 Peroxidação lipídica frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2

---



Os resultados estão apresentados na Figura 1 são relativos à peroxidação lipídica - TBARS frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2 em *Saccharomyces cerevisiae*. Verificamos que o tratamento com ficocianina diminuiu os níveis de peroxidação lipídica para as cepas BY4741-025 e SIR2-025, quando comparamos com as cepas não tratadas com ficocianina.

**Figura 1. Peroxidação lipídica frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2.**



Efeito da ficocianina na peroxidação lipídica realizada através do método TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Essas células são representadas pelas cepas controle (BY4741-025), cepa controle com mutação genética para a expressão de alfa-synucleína (BY4741-140), cepa com deleção ao gene SIR2 (SIR2-025) e a cepa com deleção ao gene SIR2 e mutação genética para a expressão de alfa-

---

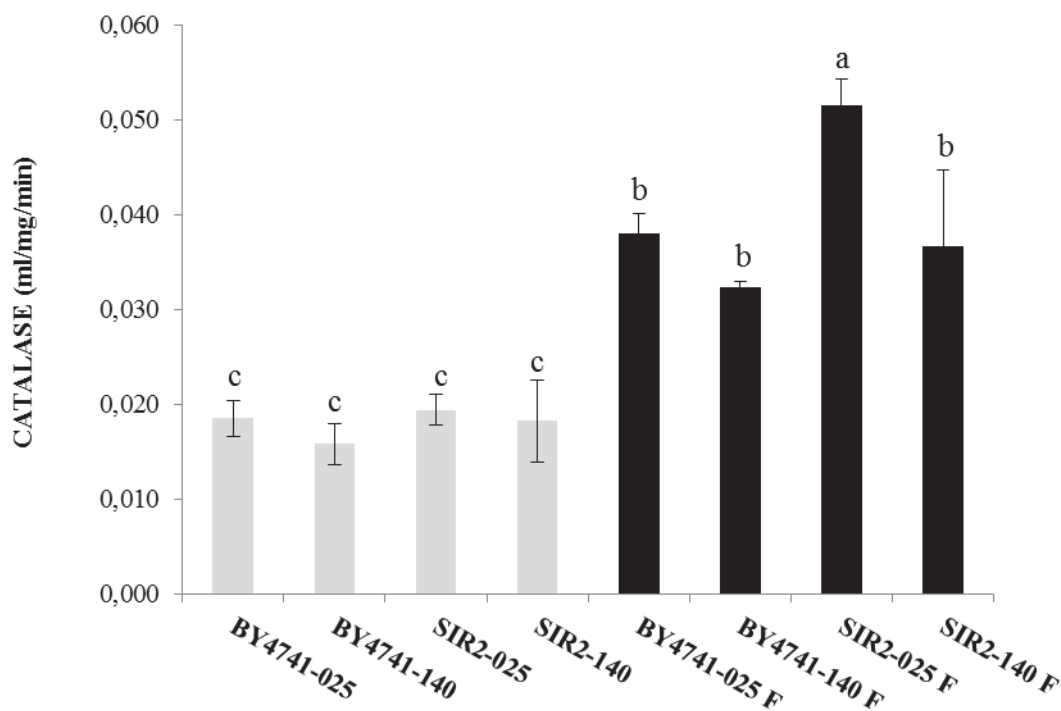
synucleína (SIR2-140), após 16h de indução em SC-ura GAL e expressão de aSyn tratados com concentrações de 48 mg/ml de extrato aquoso de ficocianina. Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

O tratamento com ficocianina foi capaz de diminuir de forma significativamente estatística os níveis de peroxidação lipídica nas cepas BY4741-025 em comparação com as cepas não tratadas com ficocianina ( $p < 0,008$ ). Essa redução nos níveis de peróxidos foi ainda mais expressiva frente à deleção do gene SIR2. A cepa SIR2-025 F comparada à cepa não tratada SIR2-025, teve diminuição significativa ( $p < 0,004$ ). Estes resultados nos mostram que a ficocianina atenuou os índices de TBARS com valores em torno de 40% na cepa SIR2-025 F.

### 2.3.2 Dosagem da atividade da CAT frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2

Os resultados da Figura 2 representam a atividade da catalase em *Saccharomyces cerevisiae* frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2. O uso da ficocianina mostrou que os índices de atividade catalase foram estatisticamente diferentes nas cepas com expressão a alfa-synucleína. Essa significância foi encontrada tanto para a cepa controle quanto para a cepa deletada ao gene SIR2.

**Figura 2. Dosagem enzimática da CAT frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2.**



As células de levedura estão representadas pelas cepas controle (BY4741-025), cepa controle com mutação genética para a expressão de alfa-synucleína (BY4741-140), cepa com deleção ao gene SIR2 (SIR2-025) e a cepa com deleção ao gene SIR2 e mutação genética para a expressão de alfa-synucleína (SIR2-140). Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

As dosagens dos níveis da atividade da CAT em *Saccharomyces cerevisiae* nos mostraram que a ficocianina reagiu de forma acentuada sobre cepa com deleção ao gene SIR2 (SIR2-025F), revelando significativo aumento na dosagem da atividade enzimática em comparação com a cepa SIR2-025 ( $p < 0,0001$ ). A deleção do gene SIR2 frente ao tratamento de ficocianina aumenta a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) resultando maior atividade da CAT sobre as células.

A ficocianina aumentou os níveis enzimáticos na cepa BY4741-025 F em comparação com a BY4741-025 ( $p < 0,0002$ ). O aumento enzimático da CAT também

---

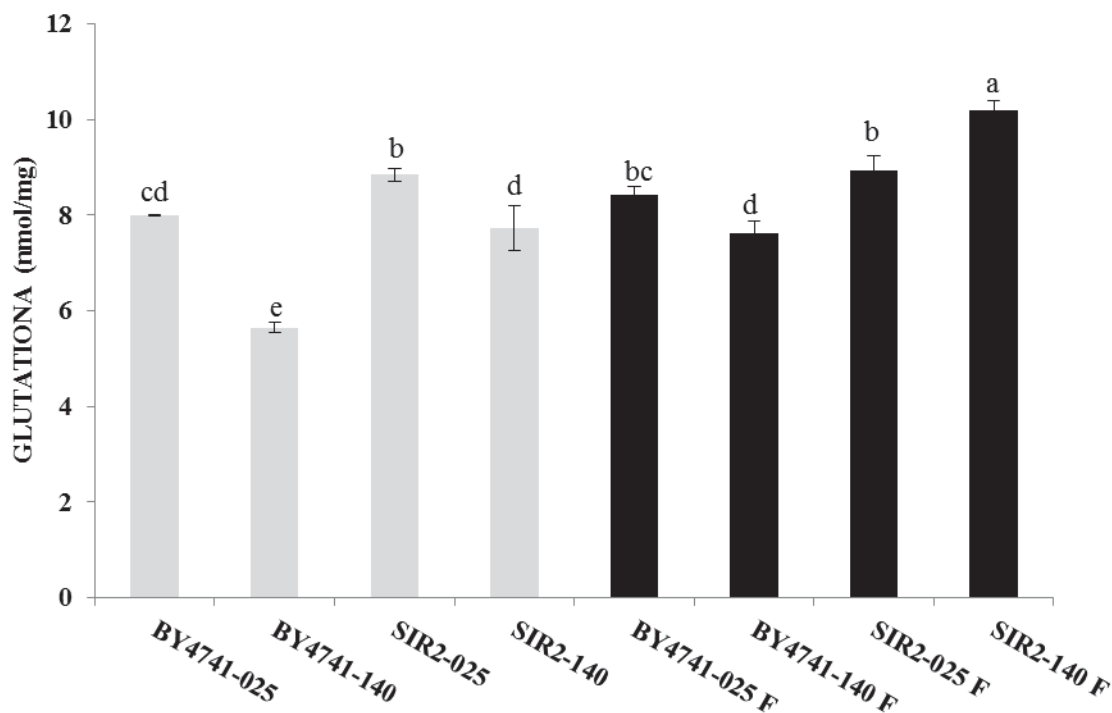
foi observado na cepa BY4741-140 F em comparação com a cepa BY4741-140 ( $p < 0,0010$ ).

Os dados mostram que a ficocianina aumentou os níveis da enzima CAT frente à expressão de alfa-synucleína, podendo ser observado através da cepa SIR2-140 F em comparação a cepas SIR2-140 sem tratamento ( $p < 0,0004$ ).

### 2.3.3 Dosagem da atividade enzimática da GPX frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2

Os resultados da Figura 3 representam a atividade da glutathione peroxidase (GPX) em *Saccharomyces cerevisiae* frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2. O uso da ficocianina mostrou diferença significativa nos índices de GPX quando as cepas expressam alfa-synucleína.

**Figura 3. Dosagem da atividade da GPX frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2.**



As células de levedura estão representadas pelas cepas controle (BY4741-025), cepa controle com mutação genética para expressão de alfa-synucleína (BY4741-140), cepa com deleção ao gene SIR2 (SIR2-025) e a cepa com deleção ao gene SIR2 e mutação genética para a expressão de alfa-synucleína (SIR2-140). Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

As cepas com expressão para alfa-synucleína tratadas com ficocianina mostraram um aumento nos níveis da atividade de GPX. A cepa BY4741-140 apresentou um aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) ( $7,61 \pm 0,25$  nmol/mg) em comparação as cepas BY4741-140 não tratadas ( $5,64 \pm 0,10$  nmol/mg). Da mesma maneira, a ficocianina aumentou os níveis sobre a cepa SIR2-140 ( $10,19 \pm 0,20$  nmol/mg) em comparação com a cepa SIR2-140 não tratada ( $7,72 \pm 0,46$  nmol/mg) ( $p < 0,0001$ ).

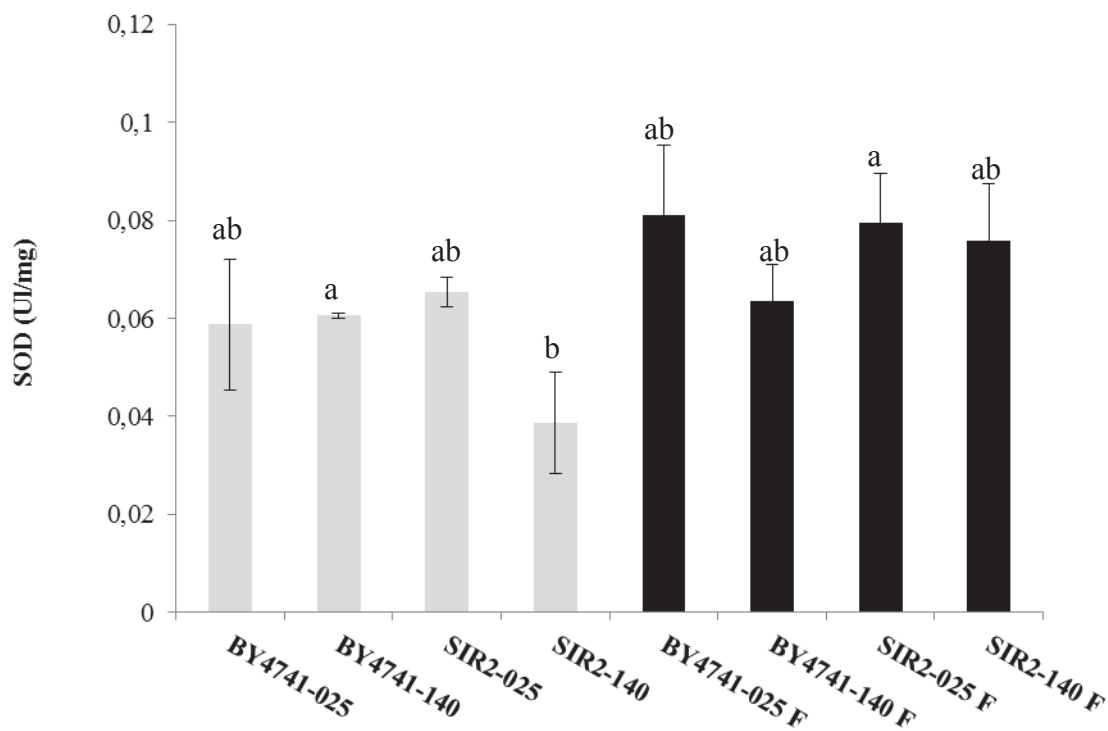
---

A cepa SIR2-140 tratada com ficocianina também mostrou um aumento significativo em comparação com as demais cepas.

#### 2.3.4 Dosagem da atividade da SOD frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2

Os resultados da Figura 4 representam a atividade da superóxido dismutase (SOD) em *Saccharomyces cerevisiae* frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2. Os resultados mostram que a ficocianina manteve constante os níveis de atividade da SOD, mostrando um aumento importante na cepa deletada ao gene SIR2 e com expressão para alfa-synucleína.

**Figura 4. Dosagem da atividade da SOD frente à toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2.**



As células de levedura estão representadas pelas cepas controle (BY4741-025), cepa controle com mutação genética para a expressão de alfa-synucleína (BY4741-140), cepa com deleção ao gene SIR2 (SIR2-025) e a cepa com deleção ao gene SIR2 e mutação genética para a expressão de alfa-synucleína (SIR2-140). Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Quando analisamos a cepa com expressão de alfa-synucleína e deletada ao gene SIR2, tratada com ficocianina, percebemos um aumento de 40 % na atividade enzimática da SOD.

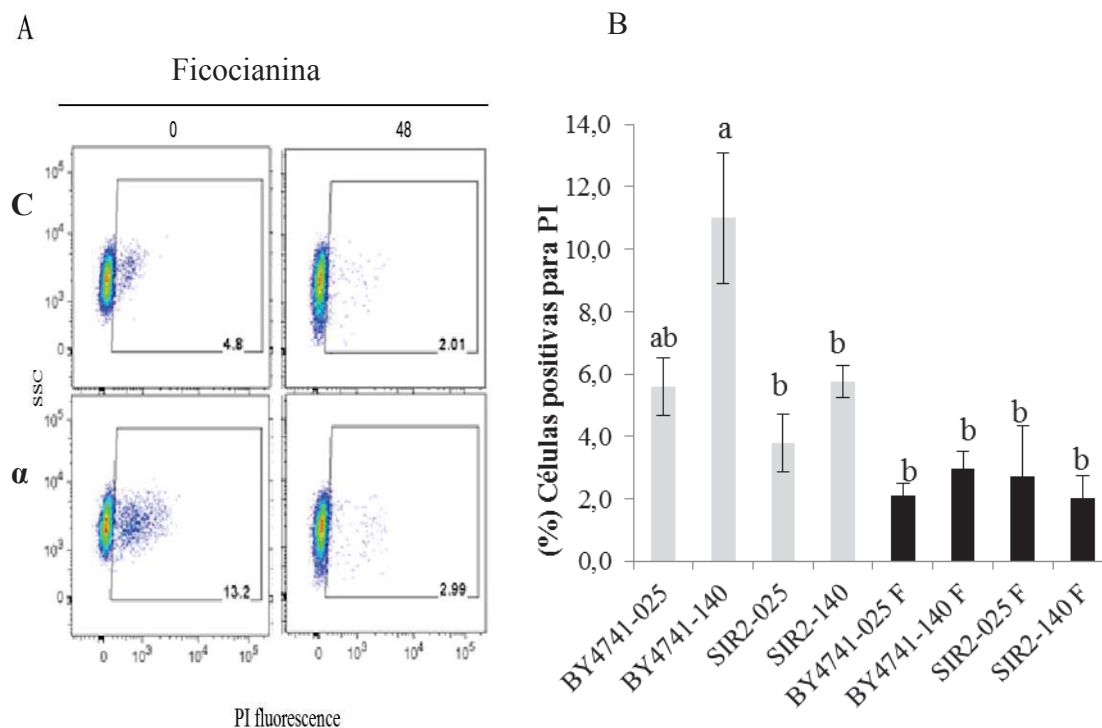
O tratamento com ficocianina sobre a atividade das enzimas endógenas do sistema de *Saccharomyces cerevisiae*, revelou aumento significativo para GPX e CAT, e manteve níveis constantes para SOD. O aumento foi mais relevante para a enzima CAT, seguida da enzima GPX. Queremos ressaltar que essa significância foi ainda mais expressiva para a deleção do gene SIR2.

### 2.3.5 Determinação da viabilidade celular

Os resultados a partir da análise de viabilidade celular por citometria de fluxo, utilizando-iodeto de propídio (PI), revelam que o tratamento com ficocianina reduziu a morte celular na cepa BY4741-140, em comparação com a cepa que não recebeu o tratamento. Estes dados mostram que o uso da ficocianina aumenta a viabilidade celular na cepa controle com expressão para alfa-synucleína (Figura 5 A e B).



**Figura 5. Determinação da viabilidade celular por PI frente à toxicidade de alfa-synucleína e deleção do gene SIR2.**



(A) Representa a morte celular pelo iodeto de propídio (PI) em células de *Saccharomyces cerevisiae* representada pelas cepa BY4741-025 e cepa BY4741-140 após tratamento com ficocianina. (B) Representa os resultados da análise de Viabilidade celular através da porcentagem de células positivas para PI, em *Saccharomyces cerevisiae* representada pelas cepas BY4741-025, cepa BY4741-140, cepa SIR2-025 e a cepa SIR2-140, tratados e não com concentração de 48 mg/ml de ficocianina. Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Os dados da Figura 5 (A) revelam que a ficocianina diminui os níveis de morte celular por PI, aumentando a viabilidade celular nas células de *Saccharomyces cerevisiae* em cepa controle e cepa com expressão de alfa-synucleína.

---

Os resultados mostram que a cepa BY4741-140 teve o maior índice de morte celular em comparação as demais cepas, e quando tratada com ficocianina, estes níveis diminuíram significativamente ( $p < 0,0012$ ).

A Figura 5 (B) mostra que a cepa SIR2-140, quando tratada com ficocianina diminui os níveis de morte celular numa porcentagem em torno de 37,6 %.

#### 2.4 Discussão

Os nossos resultados abrem novos caminhos de oportunidades para o desenvolvimento de terapias preventivas ou de reversão contra os danos causados pela toxicidade celular da alfa-synucleína a partir da utilização do ficobiliproteína ficocianina da cianobactéria *Spirulina platensis*. Também nos apresenta a evidência de possibilidade da deleção do gene SIR2 estar comprometido ou vinculado à manutenção da vida, visto os nossos resultados de aumento da atividade das enzimas antioxidantes, da atenuação da peroxidação lipídica e redução da morte celular.

Um dos principais mecanismos de lesão causada pelo estresse oxidativo como resultado da geração de radicais livres é a oxidação da camada lipídica da membrana celular, podendo levar a danos celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SAMPAIO; MORAES, 2010; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994). Os nossos resultados relativos aos níveis de peroxidação lipídica, Figura 1 nos revelam que a ficocianina diminuiu de forma significativa os níveis de peróxidos nas células em estudo ( $p < 0,004$ ). Os níveis de peroxidação lipídica foram medidos através da concentração de malonaldeído e o melhor resultado de redução foi encontrado para a cepa BY4741-025 que com o tratamento da ficocianina diminuiu significativamente ( $p < 0,008$ ), seguido da cepa SIR2-025, com diminuição de 40% nos níveis de TBARS. Salientamos que independentemente da ficocianina agir sobre a toxicidade de alfa-synucleína, ela também mostra ação antioxidante nas cepas

---

que não apresentam a expressão da proteína, efetivando seu poder protetor frente a peroxidação lipídica.

É importante ressaltar que os mecanismos pelos quais a ficocianina exerce o efeito de neuroproteção não estão totalmente elucidados, no entanto aumentam as evidências que suportam a hipótese de que o componente ficobiliproteína age como antioxidante. De acordo com Berns, (1970); Piñero Estrada et al. (2001); Romay et al, (2003) a ficocianina pode ser responsável pela inibição da lipoperoxidação e por consequência a inibição da morte neuronal por um mecanismo que envolve a eliminação do radical hidroxil. Segundo estes autores, a ficocianina quando colocada em contato com sistemas lipídicos formadores de radicais livres, passa a promover uma conjugação que reduz sua parte protéica, ocasionando interação com os radicais peroxis (PIÑERO-ESTRADA; BERMEJO; FRESNO, 2001).

A eficácia do sistema antioxidante depende do tipo de molécula geradora do estresse oxidativo, como também a localização intra ou extracelular dessa molécula. A ficocianina, substância de interesse nesse estudo atua mais diretamente no radical hidroxil, podendo assim ser utilizada para minimizar os danos à membrana celular, inibindo a formação de radicais livres e protegendo a saúde (HIRATA et al., 2001; PIÑERO ESTRADA et al., 2001; ROMAY et al, 2003). Estudos realizados por Bermejo et al. (2008), in vivo demonstraram que a ficocianina pode reduzir a peroxidação lipídica em células humanas de neuroblastoma. Outro estudo realizado por Rimbau et al. (1999), in vivo, através do modelo roedor, comprova que a administração oral de ficocianina pode reduzir a microglia, sugerindo que alguns metabolitos atravessam a barreira hematoencefálica exercendo efeito antioxidantes no hipocampo. Estes resultados segundo os autores tornam a ficocianina uma forte aliada para terapêutica da doença de Parkinson.

Os radicais livres, gerados por reações metabólicas, são os principais responsáveis pelos danos celulares causados nas doenças neurodegenerativas

---

(OUTEIRO et al., 2007). De acordo com esses autores a presença de radicais livres conduz uma reação em cadeia, que passa a alterar a conformação, a estrutura ou as funções de proteínas, fosfolipídios de membrana, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (OUTEIRO et al., 2007; YU; CHUNG, 2006). O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio ocorre devido erros na síntese das enzimas endógenas antioxidantes, quando incapazes de evitar os danos celulares (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011). A eficiência das defesas antioxidantes naturais, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione (GPX), é crucial na atenuação destes radicais livres e na possível instalação do estresse oxidativo (RISTOW; SCHMEISSER, 2011).

Nossos achados através da dosagem de marcadores enzimáticos *in vitro*, através da quantificação da atividade das enzimas CAT, GPX. e SOD revelaram que a ficocianina foi capaz de modular os parâmetros enzimáticos aumentando os níveis de atividade da CAT, GPX e SOD frente à expressão de alfa-synucleína e ainda de forma mais significativa nas cepas com expressão à alfa-synucleína e deletadas ao gene SIR2. Desta forma, queremos aqui salientar que essas atividades foram potencializadas na deleção do gene SIR2.

A ficocianina promoveu um significativo aumento da atividade enzimática da CAT sobre todas as células do presente estudo. Verificamos que os melhores índices de decomposição do peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foram encontrados de forma mais significativa para a cepa SIR2-025 ( $p < 0,0001$ ), seguido das cepas BY4741-025 ( $p < 0,0002$ ), cepa SIR2-140 ( $p < 0,0004$ ), e para a cepa BY4741-140 ( $p < 0,001$ ). Estas ações foram estatisticamente significativas, mostrando que a ficocianina agiu com efeito protetor em todas as cepas. Estas expressões foram verificadas frente à expressão da alfa-synucleína e de novo foram ainda mais significativas quando a cepa também era deletada ao gene SIR2. A enzima catalase age através da decomposição do peróxido de hidrogênio sobre as células, e possivelmente a ação da ficocianina sobre a atividade desta enzima pode ocorrer devido suas propriedades quelantes, responsáveis por

---

catalisar o processo de aparecimento de radicais livres, por conseguinte, suas propriedades antioxidantes podem promover a eliminação dos radicais livres (BERMEJO et al. 2008).

A quantificação da dosagem enzimática da GPX nos mostrou novamente que a ficocianina exerceu uma função protetora na toxicidade de alfa-synucleína, mantendo os níveis das cepas com expressão para a proteína parkinsoniana significativamente em elevação. Verificamos que os melhores índices de defesa celular foram encontrados para as cepas com expressão da alfa-synucleína e deleção do gene SIR2, cepa SIR2-140 com índices de  $(10,19 \pm 0,20 \text{ nmol/mg})$  que comparada a mesma cepa sem tratamento de ficocianina SIR2-140  $(7,72 \pm 0,46 \text{ nmol/mg})$  mostrando aumento significativo de  $(p < 0,0001)$ . Também a cepa BY4741-140  $(p < 0,0001)$   $(7,61 \pm 0,25 \text{ nmol/mg})$  mostrou um significativo aumento da atividade enzimática de GPX em comparação com a cepa BY741-140 não tratadas  $(5,64 \pm 0,10 \text{ nmol/mg})$ .

A enzima GPX, uma das principais linhas de defesa celular contra o estresse oxidativo, é um antioxidante intracelular primário e desempenha papel importante no processo metabólico da detoxificação eletrofílica sendo considerado um fiável índice de estressor oxidativo (ANDERSON et al., 1985; VANDEPUTTE et al., 1994; CLARKE et al., 1997).

Em relação à enzima superóxido dismutase a ficocianina nos mostrou sua capacidade em manter um constante nível de atividade. Verificamos que os melhores índices sob o tratamento de ficocianina, foram observados para a cepa com deleção ao gene SIR2 e expressão para alfa-synucleína, a cepa SIR2-140  $(p < 0,004)$ , onde com tratamento de ficocianina mostrou  $(0,07 \pm 0,01 \text{ UI/mg})$  em comparação a SIR2-140  $(0,03 \pm 0,01 \text{ UI/mg})$ . As dosagens dos níveis da atividade da SOD nos revelaram que a ficocianina da mesma forma como verificado para as enzimas CAT e GSH mostrou aumento frente à expressão de alfa-synucleína e esse aumento foi ainda maior frente à deleção do gene SIR2.

---

Estes dados referentes à deleção de SIR2 estão de acordo com os estudos recentes realizados pelo grupo de Outeiro, sendo que, no atual trabalho de Macedo et al., (2014) foi relatado que a enzima SOD pode estar relacionada com um papel mais direto da SIR2 quando tratada com um polifenól, componente da planta *Corema álbum*. Esta, revelou ser um agente no resgate de disfunção mitocondrial induzida por toxicidade de alfa-synucleína.

Chen et al., (2015) empregaram o modelo celular de doença de Parkinson, *Saccharomyces cerevisiae* com a expressão para alfa-synucleína e verificam que a deleção do gene SIR2 promove uma atividade de proteção e inibição contra a toxicidade de alfa-synucleína, quando analisados os níveis de SOD.

A evidência exata de como ocorre o papel neuroprotetivo da ficocianina frente à toxicidade de alfa-synucleína ainda não está elucidada, porém nossos resultados indicam que o papel protetivo da ficocianina pode ser atribuído à inibição da toxicidade de alfa-synucleína induzida pelo radical peróxido, por possuir efeito antioxidante sinérgico, possibilitando que ocorram eventos de reoxigenação pela enzima SOD produzindo uma melhor proteção (PIÑERO-ESTRADA; FRESNO, 2010).

Os nossos dados corroboram com estudos anteriores realizados pelo grupo de Bermejo et al., 2008 que também mostraram que a ficocianina pode inibir a peroxidação lipídica e aumentar a atividade de enzimas. Também nessa direção, Piñero Estrada, et al., (2001); Vadiraja et. al. (1998); Romay et. al. (2000) e Madhava Reddy et al. (2000) observaram que a ficocianina e seu cromóforo ficocianobilina foram capazes de proteger contra danos oxidativos no DNA de maneira dose dependente.

Para caracterizar ainda mais o efeito protetivo da ficocianina na toxicidade de alfa-synucleína e na deleção do gene SIR2, as células de levedura foram tratadas e analisadas pelo método de MFI (intensidade de fluorescência). Os resultados são

---

expresos em percentagem através da quantificação dos danos oxidativos pela sobrevivência celular observados na Figura 5 (A e B).

Os nossos achados revelam que as células com expressão de alfa-synucleína apresentaram maior percentual de PI, ou seja, um aumento na morte celular em comparação com as células sem expressão de alfa-synucleína (Figura 5 A e B). Verificamos que a ficocianina diminui os níveis de morte celular por PI, aumentando a viabilidade celular nas células da *Saccharomyces cerevisiae* frente à expressão da alfa-synucleína. Os resultados mostram que a cepa BY4741-140 teve o maior índice de morte celular em comparação as demais cepas, e quando tratada com ficocianina estes níveis diminuíram significativamente ( $p < 0,001$ ).

As células que expressam alfa-synucleína, quando tratadas com a ficocianina, obtiveram um aumento da viabilidade celular, com redução da morte celular em 36,7 %. Sendo que, a viabilidade celular é ainda mais preservada quando em presença da deleção do gene SIR2. Nesta situação obtivemos uma redução da morte celular em torno de 55 %.

Queremos aqui salientar um recente estudo publicado por Macedo et al., (2014) onde realizaram testes de viabilidade celular neste mesmo modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Macedo e colaboradores utilizaram o polifenol, componente das folhas de *Corema álbum*. Esta substância natural revelou ser um agente protetor muito promissor contra o estresse oxidativo e toxicidade induzida por alfa-synucleína. O polifenol aumenta a viabilidade das células reduzindo a percentagem de morte celular da levedura em 28,2 % com expressão de alfa-synucleína (MACEDO et al., 2014).

Diante destes aspectos, os nossos achados mostram que a ficocianina possui um importante papel protetivo frente à toxicidade causada pela expressão da proteína alfa-synucleína, nos parâmetros peroxidação lipídica, atividade das enzimas CAT, GSH e SOD e também na viabilidade celular. Os parâmetros avaliados nos mostraram

---

resultados ainda mais significantes quando na presença da deleção do gene SIR2. Este achado corrobora com a discussão já apresentada por outros diferentes investigadores sobre a deleção do gene SIR2 na levedura, o qual faz analogia ao gene SIR1 no homem – gene este caracterizado como o gene *lifespan* para a espécie humana. Um estudo de Sinclair e Garente, (1997) relata que as investigações sobre o envelhecimento celular mostram que a SIR2 em modelo levedura tem, pelo menos, duas atividades que possam promover a longevidade. Em primeiro lugar, reprime a instabilidade do genoma nas repetições de DNAr e, assim, diminui a formação de substâncias tóxicas circulantes, em segundo lugar, promove a segregação assimétrica de proteínas com idade por barreiras oxidativas, reduzindo os danos celulares e promovendo maior longevidade.

A ficocianina mostrou uma promissora capacidade protetora contra os danos celulares causados pela toxicidade da alfa-synucleína e esta capacidade foi aumentada quando na deleção do gene SIR2. A ficocianina diminuiu o potencial da formação de espécies reativas de oxigênio. Sabemos que a alfa-synucleína, está envolvida no aumento dos danos causados pelo estresse oxidativo e consequente morte celular e, frente a isto o tratamento com ficocianina diminui significativamente estas perdas, aumentando a viabilidade celular, bem como aumentou significativamente os níveis das enzimas endógenas do modelo em estudo, como a CAT, GPX e SOD.

## 2.5 Conclusão

A ficocianina mostrou um importante papel protetor frente à toxicidade causada pela expressão da proteína alfa-synucleína. Esta proteção foi revelada nos resultados significativos da diminuição da peroxidação lipídica e no aumento da viabilidade celular e atividade enzimática da CAT, GPX e SOD. Estes resultados foram mais significativos quando na deleção do gene SIR2.



---

Os nossos resultados possibilitam perspectivas para o desenvolvimento de terapias com o uso da ficocianina.

## 2.6 Referências

ALBANI, D. et al. The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide. *Journal of Neurochemistry*, v. 110, n. 5, p. 1445-1456, 2009. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06228.x

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*, v. 113, n. 1, p. 548-555, 1985.

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.

BACHSTETTER, A. D. et al. Spirulina promotes stem cell genesis and protects against LPS induced declines in neural stem cell proliferation. *Journal Plos One*, v. 5, n. 5, p. 496-507, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0010496.

BENDOR, J. T.; LOGAN, T. P.; EDWARDS, R. H. The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*, v. 79, n. 6, p. 1044-1066, 2013. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.004.

BERMEJO-BESCÓS, B. P.; PIÑERO-ESTRADA, E.; FRESNO, Á. M. V. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro*, v. 22, n. 6, p. 1496-1502, 2008. doi:10.1016/j.tiv.2008.05.004.

BERNS, D. S. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 38, p. 65-73, 1970.

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, n. 1, p. 1253-1259, 2009.

BEYER, K.; ARIZA, A. Alpha-synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 509-524, 2012. doi:10.1007/s12035-012-8330-5.

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 227, n. 2, p. 534-541, 1983.

CHEN, X. et al., The Sirtuin-2 Inhibitor AK7 Is Neuroprotective in Models of Parkinson's Disease but Not Amyotrophic Lateral Sclerosis and Cerebral Ischemia. *Journal Plos One*, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2015.

CHEONG, S. H. et al. Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 56, n. 1, p. 34-40, 2010.

CLARKE, J. B., FORTES, M. A., GIOVANNI, A., AND BREWSTER, D. W. Modification of an enzymatic glutathione assay for the microtiter plate and the determination of glutathione in rat primary cortical cells. *Toxicologic Method*, v. 6, p. 223-230, 1996.

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.

COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nature Neuroscience*, v. 12, n. 6, p. 359-366, 2011. doi:10.1038/nrn3039.

---

DENG, R.; CHOW, T. J. Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, v. 28, n. 4, p. 33-45, 2010. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x.

DETTMER, U. et al. In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of  $\alpha$ -synuclein and  $\beta$ -synuclein in neurons and non-neural cells. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 288, n. 9, p. 6371–6385, 2013.

DONMEZ, G. et al. SIRT1 protects against  $\alpha$ -synuclein aggregation by activating molecular chaperones. *The Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 1, p. 124-132, 2012. doi:10.1523/JNEUROSCI.3442-11.

EISBACH, S. E.; OUTEIRO, T. F. Alpha-synuclein and intracellular trafficking: impact on the spreading of Parkinson's disease pathology. *Journal of Molecular Medicine*, v. 91, n. 6, p. 693-703, 2013. doi:10.1007/s00109-013-1038-9.

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

GUARIENTI, C. et al. Viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* frente à *Spirulina platensis*. *Revista Brasileira de Ciência em Envelhecimento Humano*, v. 7, n. 1, p. 144-150, 2010. doi:10.5335/rbceh.2010.056.

HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals. In: *Biology and Medicine*. 3.ed. New York: Oxford University Press, p. 936, 1999.

HIRATA, T. et al. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, p. 435-439, 2001.

KLEIN, C.; WESTENBERGER, A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 1, p. 1-15, 2012. doi:10.1101/cshperspect.a008888.

---

MACEDO, D., et al. (Poly)phenols protect from  $\alpha$ -synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy. *Human Molecular Genetics*, v. 24, n. 3, p. 1-16, 2014. doi:10.1093/hmg/ddu585.

MADHAVA REDDY, C.; VADIRAJA, B. B.; KIRANMAI, G.; NARSA REDDY M. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 277, p. 599-603, 2000.

MANNARINO, C. et al. Requirement of glutathione for Sod1 activation during. *Yeast*, v. 28, n. 1, p. 19-25, 2010. doi:10.1002/yea.

MARQUES, O.; OUTEIRO, T. F. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. *Cell Death & Disease*, v. 3, n. 7, p. 350-357, 2012. doi:10.1038/cddis.2012.94.

MCCORD J. M; FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. v. 244, n. 22, p. 6049-55, 1969.

NELSON, D. L. COX, M. M. Lipid biosynthesis, Chapter 21, in: *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed., W.H. Freeman Publishers, New York, USA, 2005, pp. 787-832.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972.

NETO, J. M. F. A. et al. Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo Em Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: Overreaching Induzido por Treinamento de Natação e Câncer. *Revista Brasileira da Medicina do Esporte*, v. 14, n. 6, p. 548-552, 2008.

---

OUTEIRO, T. F. et al. Sirtuin 2 Inhibitors Rescue  $\alpha$ -Synuclein-Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease. *Science*, v. 317, n. 5837, p. 516-519, 2007.

OUTEIRO, T. F. et al. Formation of toxic oligomeric  $\alpha$ -synuclein species in living cells. *Journal Plos One*, v. 3, n. 4, p. 1867-1877, 2008. doi:10.1371/journal.pone.0001867.

OUTEIRO, T. F. et al. Dopamine-induced conformational changes in  $\alpha$ -synuclein. *Journal Plos One*, v. 4, n. 9, p. 690-696, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0006906.

OUTEIRO, T. F.; LINDQUIST, S. Yeast cells provide insight into  $\alpha$ -synuclein biology and pathobiology. *Science*, v. 302, n. 5651, p. 1772-1775, 2003. doi:10.1126/science.1090439.

OWUSU-ANSAH, E., YAVARI, A., BANERJEE, U. A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. Protocol Exchange, (2008) doi: 10.1038/nprot.2008.23.

PABÓN, M. M. *An Observation of Immunological Effect, a Diet Enhanced With Spirulina and Treatment With Fractalkine in Models of Parkinson's Disease*. 2011.

PACHECO, C.; AGUAYO, L. G.; OPAZO, C. An extracellular mechanism that can explain the neurotoxic effects of  $\alpha$ -synuclein aggregates in the brain. *Frontiers in Physiology*, v. 3, n. 297, p. 3-10, 2012. doi:10.3389/fphys.2012.00297.

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

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, v. 276, n. 5321, p. 2045-2047, 2003.

---

RIMBAU, V., CAMINS, A., ROMAY, C., GONZALEZ, R., PALLAS, M. Protective effects of C-phycoyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, v. 276, p. 75–78, 1999.

RISTOW, M.; SCHMEISSER, S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 51, n. 2, p. 327-336, 2011. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010.

ROMAY, C.; GONZÁLEZ, R.; LEDÓN, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein Peptide Science*, v. 4, p. 207–216, 2003.

ROMAY, C., LEDON, N., GONZALEZ, R., Effects of phycocyanin extract on prostaglandin E2 levels in mouse ear inflammation test. *Arzneimittelforschung*, v. 50, p. 1106-1109, 2000.

SAMPAIO-MARQUES, B. et al. SNCA (  $\alpha$ -synuclein ) -induced toxicity in yeast cells is dependent on sirtuin 2 ( Sir2 ) -mediated mitophagy. *Autophagy*, v. 8, n. 10, p. 1494-1509, 2012.

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

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.

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.

TENREIRO, S. et al. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, v. 127, n. 4, p. 438-452, 2013. doi:10.1111/jnc.12271.

---

---

TERAOKA, M. et al. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against  $\alpha$ -synuclein-related toxicity in catecholaminergic PC12 cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 51, n. 2, p. 122-127, 2012. doi:10.3164/jcfn.D-11-00030.

VADIRAJA, B. B; MADYASTHA, K. M. Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 285, p. 262–266, 2001. doi:10.1006/bbrc.2001.5195.

WITT, S. N. Molecular chaperones, alpha-synuclein, and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 552-560, 2012. doi:10.1007/s12035-012-8325-2.

XILOURI, M.; BREKK, O. R.; STEFANIS, L. Alpha-synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 537-551, 2012. doi:10.1007/s12035-012-8341-2.

XUAN, Q. et al. Increase expression of  $\alpha$ -synuclein in aged human brain associated with neuromelanin accumulation. *Journal of Neural Transmission*, v. 118, n. 11, p. 1575-1583, 2011. doi:10.1007/s00702-011-0636-3.

ZHOU, H. N. et al. Evaluation of arthrospira (*Spirulina*) *platensis* production trait using cpchid operon. *Pakistan Journal of Botany*, v. 45, n. 2, p. 687-694, 2013.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ficocianina revelou ser um agente promissor na capacidade protetiva contra os danos celulares causados pela toxicidade da alfa-synucleína, e apresenta capacidade protetora aumentada quando na deleção do gene SIR2. A substância mostrou que possui a capacidade de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio, podendo ser considerado um antioxidante com efeito protetor contra os agravos causados pela doença de Parkinson. Sabemos que a alfa-synucleína, está envolvida no aumento dos danos causados pelo estresse oxidativo e consequente morte celular e, frente a isto o tratamento com ficocianina diminui significativamente estas perdas, aumentando a viabilidade celular. Nossos resultados sugerem que o tratamento com ficocianina aplicado em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* diminui os níveis de peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo, apresentando efeito protetor frente à toxicidade de alfa-synucleína e proteção na deleção do gene SIR2.

Em relação aos marcadores enzimáticos, nossos achados revelaram que a ficocianina administrada em modelos que expressam toxicidade da alfa-synucleína, aumenta significativamente os níveis das enzimas endógenas, como a CAT, onde foi possível perceber a maior resposta enzimática contra os danos oxidativos em todas as cepas estudadas, em comparação com as de mais atividades enzimáticas analisadas. Evidenciou-se também aumentos significativos na atividade da GPX frente à alfa-synucleína, onde mostrou efeito protetor das proteínas celulares contra a oxidação ao longo do ciclo causando uma espécie de desintoxicação sobre os peróxidos. A ficocianina também revelou que a atividade de GPX aumenta ainda mais frente à alfa-synucleína, em conjunto com a deleção do gene SIR2, onde se observou a ação protetiva significativa. Os índices enzimáticos da enzima superóxido dismutase SOD se mantiveram constantes, revelando aumento da atividade enzimática para a expressão da alfa-synucleína e deleção do gene SIR2 com o tratamento de ficocianina. Frente aos



---

nossos achados, vimos que a ficocianina exerce um importante papel antioxidante na remoção das espécies reativas de oxigênio, devido suas propriedades protetivas frente aos danos causados pelo estresse oxidativo.

Sendo assim, os nossos resultados abrem novos caminhos de oportunidades para o desenvolvimento de terapias contra os danos causados pela toxicidade celular, já que há evidências precisas de que a alfa-synucleína esta diretamente envolvida com o aumento das espécies reativas de oxigênio, o que suporta o uso de nosso potencial antioxidante, a ficocianina, que revelou ação importante na proteção contra estes danos. A ficocianina por tanto, pode ser capaz de promover neuroproteção contribuindo como alvo terapêutico na doença de Parkinson e nas seynucleínopatias.

## REFERÊNCIAS

ALBANI, D. et al. The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide. *Journal of Neurochemistry*, v. 110, n. 5, p. 1445-1456, 2009. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06228.x.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, v. 113, p. 548-555, 1985.

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.

ARON, R.; TSVETKOV, A.; FINKBEINER, S. NUB1 snubs huntingtin toxicity. *Nature Neuroscience*, v. 16, n. 5, p. 523-525, 2013. doi:10.1038/nn.3380.

BACHSTETTER, A. D. et al. Spirulina promotes stem cell genesis and protects against LPS induced declines in neural stem cell proliferation. *Journal Plos One*, v. 5, n. 5, p. 496-507, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0010496.

BACKES, L. T. H.; SCORTEGAGNA, S. A.; BERTOLIN, T. E. Doença de Parkinson, uma perda de identidade. In: DOBNER, T. (Orgs.). Doenças crônicas: controle e reabilitação. Passo Fundo: Berthier, 2013. p. 21-32.

---

BENDOR, J. T.; LOGAN, T. P.; EDWARDS, R. H. The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*, v. 79, n. 6, p. 1044-1066, 2013. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.004.

BERMEJO-BESCÓS, B. P.; PIÑERO-ESTRADA, E.; FRESNO, Á. M. V. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro*, v. 22, n. 6, p. 1496-1502, 2008. doi:10.1016/j.tiv.2008.05.004.

BERNS, D. S. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 38, p. 65-73, 1970.

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, n. 1, p. 1253-1259, 2009.

BEYER, K.; ARIZA, A. Alpha-synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 509-524, 2012. doi:10.1007/s12035-012-8330-5.

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

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.

---

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 227, n. 2, p. 534-541, 1983.

BÜTTNER, S. et al. Synphilin-1 enhances  $\alpha$ -synuclein aggregation in yeast and contributes to cellular stress and cell death in a Sir2-dependent manner. *Journal Plos One*, v. 5, n. 10, p. 1-17, doi:10.1371/journal.pone.0013700, 2010.

CHEN, X. et al., The Sirtuin-2 Inhibitor AK7 Is Neuroprotective in Models of Parkinson's Disease but Not Amyotrophic Lateral Sclerosis and Cerebral Ischemia. *Journal Plos One*, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2015.

CHEONG, S. H. et al. Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 56, n. 1, p. 34-40, 2010.

CLARKE, J. B., et al. Modification of an enzymatic glutathione assay for the microtiter plate and the determination of glutathione in rat primary cortical cells. *Toxicologic Method*, v. 6, p. 223-230, 1996.

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.

COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nature Neuroscience*, v. 12, n. 6, p. 359-366, doi:10.1038/nrn3039, 2011.

---

COSTA, J. A. V. et al. Purification of *Spirulina platensis* Phycocyanin. *Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard*, v. 14, n. 1, p. 63-64, 2005.

COUNE, P. G. et al. An in vivo ultrahigh field 14.1 T (1) H-MRS study on 6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein-based rat models of Parkinson's disease: GABA as an early disease marker. *NMR in Biomedicine*, v. 26, n. 1, p. 43-50, 2013. doi:10.1002/nbm.2817.

DENG, R.; CHOW, T. J. Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Ther*, v. 28, n. 4, p. 33-45, 2010. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x.

DETTMER, U. et al. In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of  $\alpha$ -synuclein and b-synuclein in neurons and non-neural cells. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 288, n. 9, p. 6371–6385, 2013.

DICKSON, D. W. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 2, n. 8, p. 1-15, 2012. doi:10.1101/cshperspect.a009258.

DONMEZ, G. et al. SIRT1 protects against  $\alpha$ -synuclein aggregation by activating molecular chaperones. *The Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 1, p. 124-132, 2012. doi:10.1523/JNEUROSCI.3442-11.

EISBACH, S. E.; OUTEIRO, T. F. Alpha-synuclein and intracellular trafficking: impact on the spreading of Parkinson's disease pathology. *Journal of Molecular Medicine*, v. 91, n. 6, p. 693-703, 2013. doi:10.1007/s00109-013-1038-9.

---

FELLNER, L.; STEFANOVA, N. The role of glia in alpha-synucleinopathies. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 575-586, 2012. doi:10.1007/s12035-012-83403.

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

FREITAS, A. A.; MAGALHÃES, J. P. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutation Research*, v. 728, n. 1, p. 12-22, 2011. doi:10.1016/j.mrrev.2011.05.001.

GUARIENTI, C. et al. Viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* frente à *Spirulina platensis*. *Revista Brasileira de Ciência em Envelhecimento Humano*, v. 7, n. 1, p. 144-150, 2010. doi:10.5335/rbceh.2010.056.

HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals. In: *Biology and Medicine*. 3.ed. New York: Oxford University Press, p. 936, 1999.

HARMAN, D. The aging process. *Basic Life Sciences*, v. 49, n. 11, p. 1057-1065, 1988.

HIRATA, T. et al. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal Applied Phycology*, v.12, p.435-439, 2001.

HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, v. 425, n. 11, p. 191-196, 2003. doi:10.1038/nature01965.1.

IMAI, Y.; LU, B. Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: disordered cellular power plant becomes a big deal in a major movement disorder.

---

*Neurobiology of Disease*, v. 21, n. 6, p. 935-941, 2011.  
doi:10.1016/j.conb.2011.10.016.

JADIYA, P. et al. Sir-2.1 modulates “calorie-restriction-mediated” prevention of neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*: implications for Parkinson’s disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 413, n. 2, p. 306-310, 2011.  
doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.092.

KAEBERLEIN, M. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*, v. 464, n. 7288, p. 513-519, 2010. doi:10.1038/nature08981.

KLEIN, C.; WESTENBERGER, A. Genetics of Parkinson’s disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 1, p. 1-15, 2012.  
doi:10.1101/cshperspect.a008888.

KOURTIS, N.; TAVERNARAKIS, N. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *The EMBO Journal*, v. 30, n. 13, p. 2520-2531, 2011.  
doi:10.1038/emboj.2011.162.

KUMAR, H. et al. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson’s disease: convergence and parallelism. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 8, p. 10478-10504, 2012. doi:10.3390/ijms130810478.

LORES-ARNAIZ, S.; BUSTAMANTE, J. Age-related alterations in mitochondrial physiological parameters and nitric oxide production in synaptic and non-synaptic brain cortex mitochondria. *Neuroscience*, v. 188, n. 1, p. 117-124, 2011.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2011.04.060.

---

LÜ, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.

MACEDO, D., et al. (Poly)phenols protect from  $\alpha$ -synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy. *Human molecular genetics*, v. 24, n. 3, p. 1-16. 2014. doi:10.1093/hmg/ddu585.

MADHAVA REDDY C.; VADIRAJA B.B.; KIRANMAI G.; NARSA REDDY M. 2000. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*, *Biochemical Biophysical Research. Communications*, v. 277, p. 599-603.

MANNARINO, C. et al. Requirement of glutathione for Sod1 activation during. *Yeast*, v. 28, n. 1, p. 19-25, doi:10.1002/yea, 2010.

MARQUES, O.; OUTEIRO, T. F. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. *Cell Death & Disease*, v. 3, n. 7, p. 350-357, 2012. doi:10.1038/cddis.2012.94.

MCCORD J. M; FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. v. 244, n. 22, p. 6049-55, 1969.

MIRANDA, M. S., et al. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1075–1079, 1998.



---

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.

MUSGROVE, R. E. J.; KING, A. E.; DICKSON, T. C.  $\alpha$ -Synuclein protects neurons from apoptosis downstream of free-radical production through modulation of the MAPK signalling pathway. *Neurotoxicity Research*, v. 23, n. 4, p. 358-369, 2012. doi:10.1007/s12640-012-9352-5.

NELSON, D. L. COX, M. M. Lipid biosynthesis, Chapter 21, in: Lehninger Principles of Biochemistry, 4th ed., W.H. Freeman Publishers, New York, USA, 2005, pp. 787-832.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972.

NETO, J. M. F. A.; et al. Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo Em Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: *Overreaching* Induzido por Treinamento de Natação e Câncer. *Revista Brasileira da Medicina do Esporte*, v. 14, n. 6, p. 548-552. Nov/Dez, 2008.

OUTEIRO, T. F. et al. Sirtuin 2 Inhibitors Rescue  $\alpha$ -Synuclein-Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease. *Science*, v. 317, n. 5837, p. 516-519, 2007.

OUTEIRO, T. F. et al. Formation of toxic oligomeric  $\alpha$ -synuclein species in living cells. *Journal Plos One*, v. 3, n. 4, p. 1867-1877, 2008. doi:10.1371/journal.pone.0001867.

---

OUTEIRO, T. F. et al. Dopamine-induced conformational changes in alpha-synuclein. *Journal Plos One*, v. 4, n. 9, p. 690-696, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0006906.

OUTEIRO, T. F.; LINDQUIST, S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*, v. 302, n. 5651, p. 1772-1775, 2003. doi:10.1126/science.1090439.

OUTEIRO, T. F.; MARQUES, O.; KAZANTSEV, A. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1782, n. 6, p. 363-392, 2008. doi:10.1016/j.bbadis.2008.02.010.

OWUSU-ANSAH, E., YAVARI, A., BANERJEE, U. A protocol for in vivo detection of reactiveoxygen species. Protocol Exchange, (2008) doi: 10.1038/nprot.2008.23.

PABÓN, M. M. *An Observation of Immunological Effect, a Diet Enhanced With Spirulina and Treatment With Fractalkine in Models of Parkinson's Disease*, 2011.

PACHECO, C.; AGUAYO, L. G.; OPAZO, C. An extracellular mechanism that can explain the neurotoxic effects of  $\alpha$ -synuclein aggregates in the brain. *Frontiers in Physiology*, v. 3, n. 297, p. 3-10, 2012. doi:10.3389/fphys.2012.00297.

PAIS, T. F. et al. The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglia activation and brain inflammation. *The EMBO Journal*, v. 32, n. 19, p. 2540-2559, 2013.

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

---

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, v. 276, n. 5321, p. 2045–2047, 2013.

RALSER, M.; MICHEL, S.; BREITENBACH, M. Sirtuins as regulators of the yeast metabolic network. *Frontiers in Pharmacology*, v. 3, n. 32, p. 1-15, 2012. doi:10.3389/fphar.2012.00032.

RIMBAU, V. et al. Protective effects of C-phycoerythrin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, v. 276, p. 75–78. 1999.

RISTOW, M.; SCHMEISSER, S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 51, n. 2, p. 327-336, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010,

ROMAY, C.; et al. Phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects, *Current Protein Peptide Science*, v. 4, p. 207–216, 2003.

ROMAY, C., LEDON, N., GONZALEZ, R., Effects of phycoerythrin extract on prostaglandin E2 levels in mouse ear inflammation test, *Arzneimittelforschung* 50, v. 1, p. 1106-1109, 2000.

SAMPAIO-MARQUES, B. et al. SNCA (  $\alpha$ -synuclein ) -induced toxicity in yeast cells is dependent on sirtuin 2 ( Sir2 ) -mediated mitophagy. *Autophagy*, v. 8, n. 10, p. 1494-1509, 2012.

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

---

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.

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.

SOPER, J. H. et al. Aggregation of  $\alpha$ -synuclein in *S. cerevisiae* is associated with defects in endosomal trafficking and phospholipid biosynthesis. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 43, n. 3, p. 391-405, 2011. doi:10.1007/s12031-010-9455-5.

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

TENREIRO, S. et al. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, v. 127, n. 4, p. 438-452, 2013. doi:10.1111/jnc.12271.

TERAOKA, M. et al. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against  $\alpha$ -synuclein-related toxicity in catecholaminergic PC12 cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 51, n. 2, p. 122-127, 2012. doi:10.3164/jcbrn.D-11-00030.

TOFARIS, G. K. Lysosome-dependent pathways as a unifying theme in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 27, n. 11, p. 1364-1369, 2012. doi:10.1002/mds.25136.

TREDICI, K. Del.; BRAAK, H. Spinal cord lesions in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, v. 124, n. 5, p. 643-664, 2012. doi:10.1007/s00401-012-1028-y,

---

VADIRAJA, B. B.; MADYASTHA, K. M. Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v. 285, p. 262–266 2001. doi:10.1006/bbrc.2001.5195,

VENDEROVA, K.; PARK, D. S. Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 8, p. 93-65, 2012. doi:10.1101/cshperspect.a009365.

VIVES-BAUZA, C.; PRZEDBORSKI, S. Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*, v. 17, n. 3, p. 158-165, 2011. doi:10.1016/j.molmed.2010.11.002.

WAN, O. W.; CHUNG, K. K. K. The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *Journal Plos One*, v. 7, n. 6, p. 38545-38559, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0038545.

WEBSTER, B. R. et al. The role of sirtuins in modulating redox stressors. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 52, n. 2, p. 281-290, 2012. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.484.

WITT, S. N. Molecular chaperones, alpha-synuclein, and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 552-560, 2012. doi:10.1007/s12035-012-8325-2.

WU, L. C., et al. Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4207–4212, 2005.

---

XILOURI, M.; BREKK, O. R.; STEFANIS, L. Alpha-synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 537-551, 2012. doi:10.1007/s12035-012-8341-2.

XUAN, Q. et al. Increase expression of  $\alpha$ -synuclein in aged human brain associated with neuromelanin accumulation. *Journal of Neural Transmission*, v. 118, n. 11, p. 1575-1583, 2011. doi:10.1007/s00702-011-0636-3.

YASUDA, T.; NAKATA, Y.; MOCHIZUKI, H. A-Synuclein and Neuronal Cell Death. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 466-483, 2012. doi:10.1007/s12035-012-8327-0.

YU, B. P.; CHUNG, H. Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 127, n. 5, p. 436-443, 2006. doi:10.1016/j.mad.2006.01.023.

ZHOU, H. N. et al. Evaluation of arthrospira (*Spirulina*) platensis production trait using cpchid operon. *Pakistan Journal of Botany*, v. 45, n. 2, p. 687-694, 2013.

## ANEXOS

Anexo A. Comprovante de submissão



# PLOS ONE

## Phycocyanin in protection against alpha-synuclein toxicity and deletion of the SIR2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*

—Manuscript Draft—

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Phycocyanin in protection against alpha-synuclein toxicity and deletion of the SIR2 gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Short Title:	Phycocyanin alpha-synuclein toxicity and SIR2 gene deletion
Corresponding Author:	Telma Elita Bertolin, Ph.D University of Passo Fundo Passo fundo, RS BRAZIL
Keywords:	Spirulina platensis; Antioxidant; Alpha-synuclein; SIR2; Oxidative stress; Parkinson's disease.
Abstract:	Oxidative stress can characterize a major factor in the modulation of Parkinson's disease (PD), an increased risk neurodegenerative disease in the human aging process. From the formation alpha-synuclein protein ( $\alpha$ Syn) aggregates, a key event for periodontal disease progression, conditions of oxidative stress and toxicity are generated. An investigation of functional natural substances that can control and prevent the damage becomes important. In this study, the protective effect of phycocyanin, a cyanobacterium <i>Spirulina platensis</i> pigment, in the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> model with expression for the protein ( $\alpha$ Syn) and deletion of SIR2 gene ( $\Delta$ SIR2) were investigated. To accomplish this, lipid peroxidation parameters (TBARS), activity of SOD, CAT and GSH enzymes and cell viability were analyzed. The results showed that against the expression of alpha-synuclein and deletion of the SIR2 gene, phycocyanin increased the levels of SOD, CAT and GSH and the cell viability, and attenuates the levels of lipid peroxidation in a statistically significant form. Phycocyanin proved to be a promising functional substance in the investigation of new therapies against the damage caused by oxidative stress in neurodegenerative diseases, with emphasis on Parkinson's disease.
Order of Authors:	Luana Taís Hartmann Backes Tatiana Oro Telma Elita Bertolin, Ph.D
Opposed Reviewers:	STEPHEN GISBERG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE "EDITOR" FERENC GALLYAS UNIVERSITY OF PECS MEDICAL SCHOLL, HUNGARY "EDITOR"
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	Researcher Gaucho FAPERGS - 1111168-6 Universal Project CNPQ - 142012 Senior Estage CAPES - 18136/12-9
Please describe all sources of funding that have supported your work. A complete funding statement should do the following:  Include grant numbers and the URLs of	

## APÊNDICES

## Apêndice A. Projeto de pesquisa

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

*Ficocianina* frente à expressão de alfa-sinucleína e na deleção do gene SIR2 no  
modelo *Sacharomyces cerevisiae*

Luana Taís Hartmann Backes

# **1 Dados de identificação**

## **1.1. Título**

Ficocianina frente á expressão de alfa-sinucleína e deleção do gene SIR2 no modelo *Sacharomyces cerevisiae*.

## **1.2. Autora**

Luana Taís Hartmann Backes, Graduada em Biomedicina pela Universidade de Cruz Alta (2008), Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim (2011), Mestranda Bolsista do Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo; e-mail: luana.backes@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 Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo; e-mail: telma@upf.br

#### **1.4. Coorientadora**

Tatiana Oro, Graduação em Farmácia e Bioquímica com ênfase em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria (2004); Mestre em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (2007); Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (2013); Pós Doutoranda em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal de Rio Grande.

#### **1.5. Duração**

O mestrado terá duração de 24 meses, sendo que o período para o trabalho experimental está previsto para 6 meses.

#### **1.6. Vigência**

A pesquisa iniciará no mês de Março de 2013 e estender-se-á até Fevereiro de 2015.

#### **1.7. Resumo**

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa modulada pelo estresse oxidativo, e seu risco se aumenta no decorrer dos processos do envelhecimento humano. Quadros de toxicidade são gerados a partir da formação de agregados da proteína alfa-synucleína ( $\alpha$ Syn), evento-chave para progressão da patologia. A investigação de substâncias funcionais naturais que possam controlar e prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo se tornam importantes. Acredita-se que terapias antioxidantes possam ter um efeito funcional no controle da progressão desta doença. Neste sentido, nosso estudo objetiva avaliar o efeito da ficocianina frente à toxicidade

da expressão de alfa-sinucleína e na deleção do gene SIR2 em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Trata-se de um estudo quantitativo experimental. Para tal, será investigado o efeito protetor da ficocianina, pigmento da cianobactéria *Spirulina platensis*, no modelo *Saccharomyces cerevisiae* com expressão para a proteína ( $\alpha$ Syn) e deleção do gene SIR2 ( $\Delta$ SIR2). Serão analisados os parâmetros de peroxidação lipídica, atividade das enzimas SOD, CAT, GSH e viabilidade celular. O interesse pela realização deste estudo surgiu devido a importância e a urgência de desvendar novas terapias através de substâncias naturais com capacidades antioxidantes contra os danos causados pelo estresse oxidativo nas patologias neurodegenerativas, com ênfase para as sinucleínopatias.

### **1.8. Palavras-chave**

Alfa-Sinucleína. Doença de Parkinson. Envelhecimento celular. Estresse Oxidativo. *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2 Finalidade

Aprimoramento do conhecimento científico através de pesquisa experimental com dados e resultados voltados para a comunidade acadêmica embasados na Ciência do Envelhecimento e suas consequentes patologias neurodegenerativas, com ênfase na Doença de Parkinson e achados que indiquem novos tratamentos neuroprotetoras a partir de antioxidantes a fim de prevenir esta doença e proporcionar maior longevidade.

## 3 Problemática e questão de pesquisa

A doença de Parkinson, caracterizada como uma patologia neurodegenerativa, onde ocorre a morte dos neurônio dopaminérgicos. E mesmo com intensivos estudos sobre a base molecular dessa doença, ainda não temos uma compreensão abrangente de todos os mecanismos que comprometem o desenvolvimento desta patologia (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013; KLEIN; WESTENBERGER, 2012). A doença de Parkinson e outras sinucleinopatias, se caracterizam pelo acúmulo e a agregação da proteína alfa-synucleína, uma proteína pré-sináptica, a qual parece ser a molécula-chave responsável pela toxicidade neuronal e o consequente agravamento da patogenia (MARQUES; OUTEIRO, 2012; POLYMEROPOULOS et al., 1997; TERAOKA et al., 2012).

As estatísticas mundiais mostram que a cada 100.000 habitantes, 20 são acometidos por esta doença por ano, sendo que o risco de desenvolver esta patologia é de 1 a cada 40 indivíduos, tendo incidência de até 3% na população. Esta doença se manifesta com ênfase em pacientes idosos, e tem maior prevalência na América do Norte e Europa. A doença de Parkinson, pode ser considerada irreversível, visto que ao início dos sintomas, a substância *nigra* presente na massa encefálica já está comprometida cerca de 60% e os níveis de dopamina liberada pelos neurônios é 80%



inferior ao normal, o que caracteriza perdas neurológicas (JADIYA et al., 2011; LORES-ARNAIZ; BUSTAMANTE, 2011; OLIVEIRA et al., 2012; OUTEIRO, 2008; OUTEIRO, 2009; SAMPAIO-MARQUES, et al., 2012)

A formação dos agregados da proteína alfa-sinucleína é dependente de estímulos internos e externos, e tem forte relação com os níveis de estresse oxidativo (BEYER; ARIZA, 2012; DETTMER et al., 2013; EISBACH; OUTEIRO, 2013). A alfa-sinucleína é altamente susceptível a modificações oxidativas induzidas pelos radicais livres (PACHECO; AGUAYO; OPAZO, 2012; WITT, 2012). Estas alterações e modificações causadas pela toxicidade de alfa-sinucleína, no cérebro de pacientes afetados pela doença de Parkinson, tem sido indicadas pelo acúmulo de inclusões dos corpos de Lewy que contém substâncias fosforiladas, causadas pelo estresse oxidativo (XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2012; XUAN et al., 2011; OUTEIRO, et. al. 2008; OUTEIRO, et al., 2009).

Estudos indicam que a modulação do estresse oxidativo nas células pode ter também relação com o gene SIR2. O estresse oxidativo apresenta envolvimento com as sirtuínas, que são proteínas desacetilases e possuem capacidade de regulação metabólica contra os efeitos do envelhecimento. Pouco se sabe sobre a função das sirtuínas na doença de Parkinson, no entanto, pesquisas sugerem que a deleção do gene SIR2 tenha efeito potencial na expressão de alfa-sinucleína, diminuindo a proteção das células contra o estresse oxidativo. Nesta perspectiva, a ciência vem buscando terapias que possam caracterizar um controle eficiente contra o processo de toxicidade e na deleção do gene SIR2 (OUTEIRO et al., 2007).

Diante deste contexto, a identificação de novas estratégias de intervenção terapêutica é de grande importância e urgência, a fim de controlar os danos causados pelo estresse oxidativo e evitando a morte celular. Esta esperança pode advir do uso de substâncias antioxidantes naturais, com propriedades benéficas que possam evitar a sobrecarga de radicais livres no organismo e proteger da oxidação de moléculas (PABÓN, 2011; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012). Neste sentido, acredita-se que a ficocianina, composto aquoso da microalga *Spirulina platensis*, fonte funcional de capacidades antioxidantes possa apresentar propriedades benéficas na manutenção dos

danos causados pelo estresse oxidativo. É de fundamental importância o desenvolvimento de estudos na prevenção e controle do acúmulo das proteínas geradoras de toxicidade. Espera-se no entanto, que a ficocianina tenha um papel protetivo no controle da toxicidade causada pela agregação da alfa-sinucleína e na deleção do gene SIR2, em modelo *Saccharomyces cerevisiae*.

Nesse contexto, surge a seguinte indagação: A ficocianina teria um efeito protetor frente à toxicidade da alfa-sinucleína e na deleção do gene SIR2 em modelo *Saccharomyces cerevisiae*?

## 4 Justificativa

O interesse pela realização deste trabalho surgiu devido à relevância do assunto e a importância e urgência na elucidação de novas terapias advindas de substâncias naturais com propriedades funcionais, a fim de encontrar formas de controle e prevenção para os eventos biológicos e patológicos do processo de envelhecimento, condizente com as doenças neurodegenerativas, em especial a, a toxicidade gerada na doença de Parkinson.

O envelhecimento traz consequências, e de acordo com as estatísticas mundiais o surgimento das doenças neurodegenerativas vem aumentando a cada ano. O motivo para este fenômeno é explicado com o aumento da longevidade, em que as pessoas estão vivendo mais, porém, acompanhadas por quadros de demência com maior frequência devido estas patologias acometerem especialmente pessoas idosas. É importante elucidar e pesquisar novas formas terapêuticas para modificar os percentuais neurodegenerativos a fim de controlar estes quadros e diminuir essas perdas (WALES et al., 2013).

O comprometimento neurológico causado pela doença de Parkinson pode ser considerado irreversível. Com os avanços científicos, a etiologia da doença de

Parkinson vem tomando caminhos cada vez mais inovadores, proporcionando novas tentativas terapêuticas para o controle desta doença (DICKSON, 2012).

Na doença de Parkinson são gerados corpos de Lewy, compostos por agregados da proteína alfa-sinucleína. Evidências mostram que a deleção do gene SIR2 potencializa o processo de agregação da alfa-sinucleína, e está diretamente ligado a sua toxicidade (OUTEIRO et al., 2007). Estudos enfatizam que as sirtuínas apresentam possível capacidade bloqueadora da lesão neuronal, incluindo a inibição do processos de agregação da alfa-sinucleína (MARQUES; OUTEIRO, 2012). A SIR2 mostra ser um essencial mediador de toxicidade no controle da autofagia e mitofagia, que estão envolvidos no processo de morte dos neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson (SAMPAIO-MARQUES et al., 2012).

Devido alto consumo de oxigênio pelo cérebro, os neurônios dopaminérgicos estão expostos aos danos e essa condição é relacionada à patogênese de muitas doenças neurodegenerativas. Os danos celulares tem origem na superprodução ou no desequilíbrio das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e resultam do ataque a macromoléculas que escapam à sua neutralização, ou quando ocorre um desequilíbrio com consequente ataque entre compostos oxidantes e antioxidantes (KUMAR et al., 2012).

Baseado nisso, novas substâncias devem ser conhecidas para controlar os danos causados pelo estresse oxidativo podem advir da utilização de substâncias naturais, que tenham capacidades antioxidantes frente aos danos causados pela sobrecarga de radicais livres no organismo, protegendo da oxidação de moléculas a fim de evitar o desenvolvimento de sinucleinopatias (PABÓN, 2011; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012).

Diante destes fatos, surgem fontes funcionais como a ficocianina, uma ficobiliproteína, é o principal componente do extrato aquoso da microalga *Spirulina platensis*. Caracterizada como uma cianobactéria fotossintetizante, a ficocianina, possui propriedades importantes por ser uma proteína natural, solúvel em água e com alta estabilidade e microrganismo provido de mecanismos fisiológicos e biomoleculares

fortemente desenvolvidos para defesa contra espécies reativas de oxigênio (BERMEJO, 2008; GRUDEN, 2012; PABÓN, 2012; ZHOU, 2012, YU; CHUNG; 2011). A Ficocianina vem sendo apresentada com potenciais terapêuticos importantes por possuir capacidades funcionais para a ação nutracêutica, para a ação anticolesterolêmica (bertolin et al 2009), propriedades antiinflamatórias e antibacterianas, além de capacidade estimulante do sistema imunológico (BERMEJO, 2008; BERTOLIN et al., 2009; COLLA; BAISH; COSTA, 2008; CHEONG et al., 2010; DENG, et al., 2010).

Neste sentido, em nosso estudo a ficocianina será analisada *in vitro*, quanto a capacidade de proteção frente à toxicidade da alfa-sinucleína e na deleção do gene SIR2, através da peroxidação lipídica, viabilidade celular e atividade de enzimas antioxidantes autógenas SOD, CAT, GSH, do sistema celular de *Saccharomyces cerevisiae*. mimetizando a neurodegeneração presente na doença de Parkinson, com intuito de encontrar nesta substância as propriedades necessárias para novas terapias controladoras e preventivas destas patologias.

## **5 Objetivo da pesquisa**

### **5.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito protetor da ficocianina frente à toxicidade causada pela expressão da proteína alfa-sinucleína e à deleção do gene SIR2 em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Analisar o efeito da ficocianina frente à deleção do gene SIR2 e à expressão da proteína alfa-sinucleína na peroxidação lipídica e sobre a atividade de enzimas

(CAT, SOD, GSH) do sistema antioxidante endógeno da leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

- Avaliar a viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cepas deletadas ao gene SIR2 e com expressão da proteína alfa-sinucleína.

## 6 Fundamentação teórica

As temáticas abordadas na revisão de literatura contribuem para o desenvolvimento da pesquisa sendo: Envelhecimento, Doenças neurodegenerativas no envelhecimento, Doenças de Parkinson, Proteína parkinsoniana alfa-sinucleína, Disfunção mitocondrial, Radicais livres e estresse oxidativo, Antioxidantes como substâncias funcionais, *Spirulina platensis* e ficocianina, Modelo levedura *Saccharomyces cerevisiae* e Sirutínas - SIR2.

### 6.1. Envelhecimento

O processo de envelhecimento é um fenômeno que se manifesta ao longo da vida, entre indivíduos de espécies distintas. Este processo depende de variados aspectos que ultrapassam limiares da cronologia, pois cada indivíduo reage de forma única ao avançar da idade. Trata-se de um declínio progressivo na vitalidade ao longo do tempo, conhecido como senescência, em que as células deixam de se dividir para substituírem outras que, por alguma razão, deixam de metabolizar e então morrem (KENYON, 2010). Este fenômeno se caracteriza pela perda de funcionalidade progressiva decorrente da idade, com consequente aumento da susceptibilidade e incidência de doenças, aumentando a probabilidade de morte (DONMEZ; GUARENTE, 2010).

O envelhecimento é um fenômeno de amplitude global, atualmente se observa notável crescimento da população idosa em relação aos demais grupos etários. A

porcentagem da população idosa no mundo tem demonstrado um significativo aumento, e a perspectiva para 2050 é que 22% da população mundial seja de idosos, sendo os idosos com 80 ou mais anos o grupo etário de maior crescimento no mundo (NOALE et al., 2012; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

O Brasil, anteriormente referido como um país de pessoas jovens, está vivenciando uma transição demográfica e passa por um processo de envelhecimento populacional, fato atribuído ao aumento da expectativa de vida bem como a redução da natalidade. É previsto que em 2020, 34 milhões de brasileiros estarão acima de 60 anos, fato que colocará o Brasil na sexta posição entre as nações mais envelhecidas (SZWARCOWALD et al., 2011).

No entanto, a população está vivendo mais, havendo um relativo aumento na longevidade. Consequências deste fenômeno são associadas à mudanças na atividade das células, tecidos e órgãos, e também na redução da eficácia de um conjunto de sistemas fisiológicos, característicos do processo biológico de envelhecimento do ser humano. Esta perda funcional é progressiva, sendo fator de fragilidade física ou mental, tornando o indivíduo idoso mais suscetível a doenças crônicas (KIM, 2007; NOALE et al., 2012).

Os mecanismos moleculares ligados ao envelhecimento e doenças relacionadas à idade, bem como o próprio aumento a susceptibilidade às doenças, não são totalmente compreendidos. Este fato tem atraído a comunidade acadêmica na busca de novas descobertas e terapias a fim de aliar longevidade com melhor qualidade de vida (KIM, 2007; SZWARCOWALD et al., 2011).

Dentre as assertivas hipóteses abordadas nas teorias do envelhecimento, verifica-se a influência do processo oxidativo no envelhecimento celular. Este processo foi descrito por Harman em 1956, em que propunha que o envelhecimento estava associado a moléculas produzidas pelo metabolismo oxidativo, denominadas radicais livres. De acordo com o autor, o fenômeno de envelhecimento é o resultado do acúmulo de lesões moleculares provocadas pelas reações dos radicais livres nos componentes celulares ao longo da vida, que conduzem à perda de funcionalidade celular e à doenças

relacionadas com o aumento da idade, conduzindo à morte (BERTOLIN; FURLONG; COSTA, 2006; FREITAS; MAGALHÃES, 2011; HARMAN, 1988; JIN, 2010; MOTA; FIGUEIREDO; DUARTE, 2004; RISTOW; SCHMEISSER, 2011; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

Embora seja aleatório e incontrolável, o declínio senescente é amplamente influenciado por fatores genéticos e extrínsecos. Numerosas mutações genéticas e intervenções surgem com intuito de prolongar o tempo de vida de organismos unicelulares desde a levedura *Saccharomyces cerevisiae* até o primata (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011; KENYON, 2010; KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011).

De acordo com Outeiro et al. (2007), o envelhecimento é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson. Embora a base molecular destes mecanismos precise ainda ser desvendada, sendo fundamental uma melhor compreensão da dinâmica e interação recíproca entre as respostas aos danos causados pelo estresse oxidativo e o fenômeno de envelhecimento, a fim de garantir o desenvolvimento de novas terapêuticas explorando caminhos que vão contra as patologias associadas à idade, principalmente as doenças neurodegenerativas (OUTEIRO et al., 2007).

## **6.2. Doenças Neurodegenerativas no Envelhecimento**

As doenças neurodegenerativas ainda geram dúvidas frequentes, principalmente a respeito de sua origem, a comunidade científica ainda está em busca de melhores respostas e novas terapias, tendo em vista que estas doenças podem ser causadas pelo aumento dos níveis de estresse oxidativo, que poderia ser também uma consequência em favor de seu agravamento (ULUSOY; MONTE, 2012; YASUDA; NAKATA; OCHIZUKI, 2012).

No entanto, há muitas questões ainda a serem respondidas sobre o envelhecimento do cérebro e o papel das vias conservadoras no surgimento e da

progressão das doenças neurodegenerativas, assim, a função do cérebro como integrador central das alterações fisiológicas no processo de envelhecimento vem sendo alvo de constantes pesquisas (KARASOVA et al., 2013).

Estudos referentes aos sistemas cerebrais de ordem cognitiva elevada se tornam menos eficazes com o avançar da idade, ocorrendo uma desconexão entre as áreas do cérebro que normalmente funcionam interligadas, em adultos jovens. Esses autores ressaltam a importância do funcionamento cerebral na ampliação das redes cognitivas e da expansão dos conhecimentos sobre a base molecular do envelhecimento do cérebro e a atuação deste órgão no envelhecimento do corpo, para que seja possível interferir e tratar o declínio cognitivo (BEYER; ARIZA, 2012).

O envelhecimento pode ser reconhecido como um mediador de doenças neurodegenerativas, e a causalidade está relacionada ao acúmulo de proteínas, que geram toxicidade, decorrentes dos fatores ambientais. (BROADLEY; HARTL, 2009; DIMANT; EBRAHIMI-FAKHARI; MCLEAN, 2012; OUTEIRO; MARQUES; KAZANTSEV, 2008). Neste sentido ocorre a perda de neurônios dopaminérgicos, onde presença de inclusões proteicas citoplasmáticas chamadas corpos de Lewy, nos poucos neurônios dopaminérgicos sobreviventes, é a característica marcante na patologia da doença de Parkinson (VIVES-BAUZA; PRZEDBORSKI, 2011; WALES et al., 2013).

### **6.3. Doença de Parkinson**

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa característica do envelhecimento. As estatísticas atuais mostram que para cada 100.000 habitantes 20 indivíduos são acometidos pela doença por ano, tendo uma incidência de até 3% na população mundialmente (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011). Esta doença se manifesta principalmente em pacientes idosos, e tem maior prevalência na América do Norte e Europa (MUSGROVE; KING; DICKSON, 2012).

Em 1817, o cientista James Parkinson, pioneiro dos estudos referentes à doença de Parkinson, caracterizou esta doença como uma enfermidade causada pela presença de



movimentos tremulantes involuntários, com suscetível diminuição da força muscular, tendência a inclinação do tronco para frente e alteração da marcha, em que os sentidos e o intelecto permanecem preservados (JIN, 2010). Assim, a capacidade cognitiva do paciente encontra-se limitada. Anos após, o neurologista Jean-Martin Charcot acrescentou anormalidade no tônus muscular e na cognição, sugerindo então dar o nome de doença de Parkinson em reconhecimento da descrição realizada em 1817 (BACKES; SCORTEGAGNA; BERTOLIN, 2013; DICKSON, 2012; FREITAS; MAGALHÃES, 2011; MOTA; FIGUEIREDO; DUARTE, 2004).

A doença de Parkinson leva a disfunção e a perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos presentes na substância *nigra* do cérebro, responsáveis pela secreção do hormônio dopamina nos gânglios da base, que controlam e ajustam a transmissão dos comandos conscientes vindos do córtex cerebral para os músculos do corpo humano (FELLNER; STEFANOVA, 2012). Não somente os neurônios dopaminérgicos, mas outras estruturas produtoras de serotonina, noradrenalina e acetilcolina estão envolvidas na gênese da doença (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011; IMAI; LU, 2011; KUMAR et al., 2012; MARQUES; OUTEIRO, 2012; TOFARIS, 2012; TREDICI; BRAAK, 2012; VENDEROVA; PARK, 2012).

Hipóteses sugerem que a origem desta patologia está relacionada ao estresse oxidativo resultante da exposição aos metais ou toxinas ambientais e profunda disfunção mitocondrial (COUNE et al., 2013; VENDEROVA; PARK, 2012; VIVES-BAUZA; PRZEDBORSKI, 2011).

Por tanto, a doença de Parkinson, se caracteriza diretamente pelo acúmulo e a agregação da proteína que representa ser a molécula-chave responsável pela toxicidade neuronal e o conseqüente agravamento da patogenia, conhecida como alfa-sinucleína, sendo este o primeiro gene a ser identificado e associado com a doença de Parkinson (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013; KLEIN; WESTENBERGER, 2012; MARQUES; OUTEIRO, 2012; POLYMEROPOULOS et al., 1997; TERAOKA et al., 2012).

Durante o envelhecimento normal os níveis de dopamina caem 50%, sendo que um indivíduo com 80 anos de idade pode ter até 50% das proteínas oxidadas, na doença de Parkinson 80% da dopamina estriatal é perdida (KUMAR et al., 2012).

Neste sentido, entende-se que o comprometimento neurológico causado pela doença de Parkinson pode ser considerado irreversível, sabendo-se que ao surgirem os sintomas, o sistema neuronal já está acometido pela diminuição dos níveis de dopamina em 80%, que atenua o acúmulo e agregação das proteínas responsáveis pela toxicidade neuronal (BACKES; SCORTEGAGNA; BERTOLIN, 2013; PACHECO; AGUAYO; OPAZO, 2012).

Neste sentido, o interesse pela cura da doença de Parkinson ainda não é conhecida pela ciência, no entanto a possibilidade em manter o controle desta patologia e das demais sinucleinopatias pode advir do uso de terapias antioxidantes naturais (MARQUES; OUTEIRO, 2012).

#### **6.4. Proteína parkinsoniana Alfa-sinucleína**

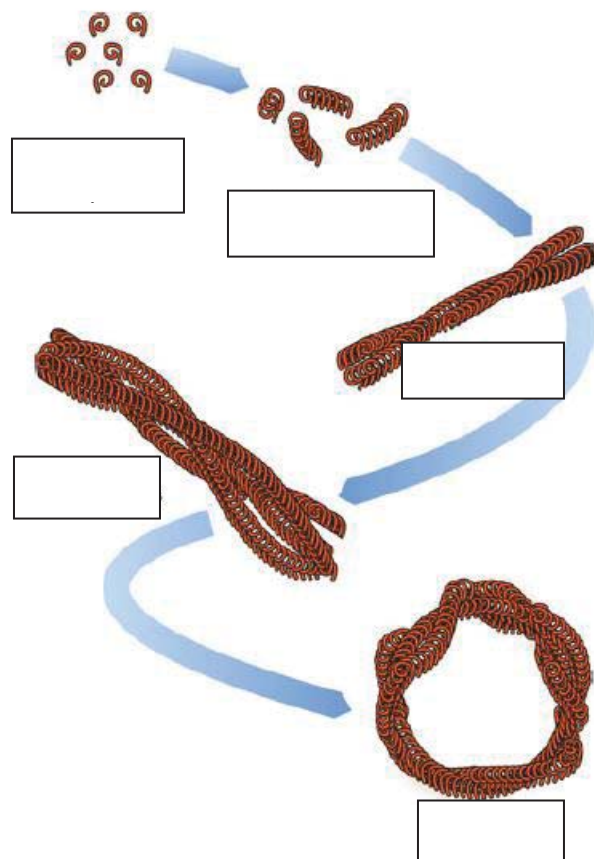
Alfa-sinucleína é caracterizada por ser uma proteína composta por 140 aminoácidos com um peso molecular aproximado de 14 kDa, que está primariamente presente nos terminais pré-sinápticos não amiloides apresentando também uma localização nuclear e, mais recentemente, foi detectada sua presença na mitocôndria. (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013; MARQUES; OUTEIRO, 2012; SOPER et al., 2011).

A alfa-sinucleína possui uma estrutura de proteína desdobrada que em condições fisiológicas pode assumir estrutura helicoidal, formando agregados insolúveis, ligando-se preferencialmente a membranas celulares onde passa a gerar quadros de toxicidade nas sinapses. Estes quadros levam à disfunção do transporte axonal, e à consequente redução da liberação de neurotransmissores, fazendo com que o processo degenerativo seja agravado e caracterizando um fator de risco na doença de Parkinson (EISBACH;

OUTEIRO, 2013; OUTEIRO et al., 2009; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012). A Figura 1 ilustra como ocorre a agregação e toxicidade da alfa-sinucleína.

**Figura 1.** Processo de agregação e toxicidade da proteína alfa-sinucleína.

Fonte: Eisbach e Outeiro (2013).



A alfa-sinucleína na forma solúvel é atacada pelas vesículas sinápticas e outras membranas incluindo as organelas sinápticas. O conteúdo dopaminérgico é transportado até o axônio ao longo de microtúbulos em direção a periferia da célula. Sob condições patológicas, a alfa-sinucleína se acumula em oligômeros e agregados, que leva à disfunção do transporte axonal, ocorrendo assim a diminuição da liberação de neurotransmissores (EISBACH; OUTEIRO, 2013).

Considerada a peça chave na doença de Parkinson, a alfa-sinucleína é o componente primário dos Corpos de Lewy, que são estruturas celulares presentes nos neurônios afetados devido a diminuição do hormônio dopamina (TREDICI; BRAAK, 2012; WAN; CHUNG, 2012). Achados dos Corpos de Lewy nos neurônios sobreviventes levantam a ideia de que o menor peso molecular da proteína alfa-sinucleína pode constituir as espécies tóxicas (MARQUES; OUTEIRO, 2012; OUESLATI et al., 2012; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012). A formação de agregados de alfa-sinucleína tem forte relação com o aumento dos níveis de estresse oxidativo (BEYER; ARIZA, 2012; DETTMER et al., 2013; EISBACH; OUTEIRO, 2013; PACHECO; AGUAYO; OPAZO, 2012; WITT, 2012).

Assim, sugere-se que a alfa-sinucleína seja um modulador negativo na neurotransmissão, devido à expressão desta proteína alterar a captação de dopamina pelo transportador membranar (GONÇALVES; OUTEIRO, 2013; OUTEIRO et al., 2008; PERFEITO; REGO, 2011). A alfa-sinucleína está ainda diretamente envolvida no recrutamento da dopamina e na compartimentalização pré-sináptica da mesma. Acredita-se que a interação desta proteína com as vesículas sinápticas poderá ser crítica para a sua função normal, tendo influência patológica na doença de Parkinson (ANGOT et al., 2012; FELLNER; STEFANOVA, 2012; TOFARIS et al., 2011; WALES et al., 2013; WITT, 2012).

Apesar de o mecanismo de toxicidade da alfa-sinucleína ainda não está bem esclarecido em relação ao transporte axonal e à integração de resqúícios neurais quanto à questão das membranas receptoras (EISBACH; OUTEIRO, 2013). No entanto, sabe-se que ela promove um processo de agregação através da formação dos grumos que passam a gerar toxicidade, agravando as patologias neurodegenerativas (OUTEIRO et al., 2009).

As alterações e modificações causadas pela toxicidade de alfa-sinucleína no cérebro de pacientes afetados pela doença de Parkinson e outras alfa-sinucleopatias, tem sido indicadas pelo acúmulos de inclusões dos corpos de Lewy que contém substâncias fosforiladas, causadas pelo estresse oxidativo (XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2012; XUAN et al., 2011).

Evidências sugerem que a agregação é o evento-chave que aciona a neurotoxicidade mediada pela alfa-sinucleína nas doenças neurodegenerativas, o que direciona pesquisas científicas quanto às propriedades funcionais desta proteína (GONÇALVES; OUTEIRO, 2013; MARQUES; OUTEIRO, 2012; TENREIRO; OUTEIRO, 2010; TREDICI; BRAAK, 2012; XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2012).

Assim, a compreensão estrutural e fisiológica da proteína a nível molecular é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias que possam manter o controle das patologias envolvidas, sobretudo, a possível esperança de cura para a doença de Parkinson (CALDINELLI; ALBANI; POLLEGIONI, 2013; GUERRERO et al., 2013).

### **6.5. Disfunção mitocondrial, como processo envolvido na neurodegeneração em Doença de Parkinson**

As mitocôndrias são organelas celulares muito importantes na produção de energia na forma de ATP. Elas são produtoras de espécies reativas de oxigênio, de acordo com a premissa da teoria dos radicais livres na disfunção mitocondrial do envelhecimento. De acordo com esta teoria, o estresse oxidativo ataca mitocôndrias levando ao aumento dos danos oxidativos (HARMAN, 1988; RISTOW; SCHMEISSER, 2011). Como consequência, as mitocôndrias danificadas tornam-se progressivamente menos eficientes, e perdem sua integridade funcional passando a liberar mais moléculas de oxigênio. Isso causa maiores danos oxidativos e culmina no acúmulo de mitocôndrias disfuncionais de acordo com a idade (AMARAL et al., 2013; ESTEVES et al., 2011; LI et al., 2010; PABÓN, 2011; PERFEITO; REGO, 2011).

A disfunção mitocondrial é um processo neurodegenerativo que ocorre juntamente com a agregação e toxicidade causada pela morte celular dos neurônios dopaminérgicos (ABOU-SLEIMAN; MUQIT; WOOD, 2006; IMAI; LU, 2011) e vem sendo implicada na patogênese da doença de Parkinson (BUTLER et al., 2012; SCHAPIRA, 2007).

Embora a causa das doenças neurodegenerativas ainda não tenha sido completamente elucidada, fatores de predisposição genética, juntamente com agentes ambientais são fatores que para desencadeiam uma cascata de eventos deletérios, que acredita-se estarem envolvidos na disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e o processo de expressão das proteínas bem como a falha do mecanismo de degradação destas proteínas, o qual, leva a morte dos neurônios dopaminérgicos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; PERFEITO; REGO, 2011; VIVES-BAUZA; PRZEDBORSKI, 2011).

Características patológicas proeminentes da doença de Parkinson incluem disfunção mitocondrial e o acúmulo de inclusões de proteína em corpos de Lewy. Estes fenótipos da doença podem surgir a partir de deficiências na qualidade dos sistemas de controle das mitocôndrias e proteínas celulares citoplasmáticas envolvendo fissão mitocondrial, e autofagia, pelo comprometimento da via da ubiquitina-proteossoma podendo induzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria (KUMAR et al., 2012; TAKEDA et al., 2010; TENREIRO et al., 2013).

Desta maneira, a mitocôndria afetada é posteriormente removida pela via autofágica e ocorre a diminuição da biogênese mitocondrial (EISBACH; OUTEIRO, 2013; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012; TAKEDA et al., 2010; XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2012). Assim, as vias para a síntese de proteínas, controle de qualidade, manutenção mitocondrial e dinâmica mitocondrial são mecanicamente interconectados na patogênese da doença e representam novos alvos para a prevenção e tratamento.

A conexão entre a disfunção mitocondrial e a autofagia, constitui um processo autodestrutivo de morte celular, decorrente do processo de envelhecimento da célula, sendo evidente em diversas doenças, especialmente nas doenças neurodegenerativas (MADEO; TAVERNARAKIS; KROEMER, 2010; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012; TENREIRO et al., 2013; VIVES-BAUZA; PRZEDBORSKI, 2011).

Neste sentido, pesquisas científicas dirigidas às funções patológicas de mitocôndrias em doença de Parkinson levantam a possibilidade de que as toxinas ambientais que afetam a mitocôndria representam a principal causa de doença de

Parkinson, sendo caracterizadas como toxinas mitocondriais indutoras de parkinsonismo (IMAI; LU, 2011; WALES et al., 2013).

## **6.6. Radicais Livres e Estresse oxidativo, sua relação com a Doença de Parkinson**

O processo biológico pelo qual todas as espécies vivas passam, e que age todos os dias em diferentes variedades desde a aparência física até a comportamental, é o processo de envelhecer, sendo caracterizado por uma diminuição no funcionamento fisiológico do organismo, bem como um aumento na incidência de doenças que podem conduzir à morte (KUMAR et al., 2012). Estudos apontam como aspectos de maior responsabilidade no envelhecimento humano, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RISTOW; SCHMEISSER, 2011). Nas últimas décadas, pesquisas foram desenvolvidas para esclarecer o papel destas espécies em processos fisiopatológicos diversos (KIRKWOOD; AUSTAD, 2000; KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011; YU; CHUNG, 2006).

A teoria dos radicais livres no processo de envelhecimento, originalmente proposta por Harman (1956), estabelece que as espécies reativas de oxigênio estariam envolvidas e seriam responsáveis por causar danos celulares, resultando em aceleração de disfunções e levando ao desenvolvimento de desordens orgânicas (HARMAN, 1988; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010). Em adição à teoria, o envelhecimento também decorreria da ação tóxica dos radicais livres. Segundo Freitas e Magalhães (2011), os radicais livres poderiam ser responsáveis, além dos danos celulares, por mutagêneses, cânceres, bem como, pelo processo degenerativo do envelhecimento biológico (FREITAS; MAGALHÃES, 2011).

Radicais livres são caracterizados como átomos, podendo estar em grupos ou moléculas que possuem elétrons livres não-pareados em sua camada orbital externa, o que explica sua instabilidade e elevada reatividade (KUMAR et al., 2012). A condição ímpar pode originar-se pela perda ou ganho de um único elétron. Uma vez formados,

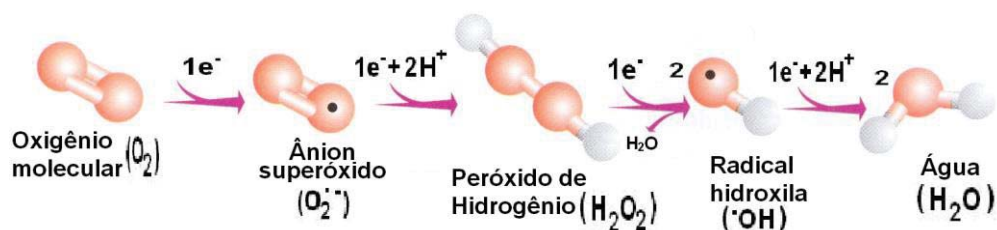
estes elétrons buscam se estabilizar cedendo ou doando um elétron de espécies químicas vizinhas. Estes por sua vez passam a ser os Radicais Livres. Desta forma, origina-se uma reação em cadeia, que termina por alterar a conformação, a estrutura ou as funções de proteínas, fosfolipídios de membrana, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (JIN, 2010; OUTEIRO et al., 2007; YU; CHUNG, 2006).

Neste sentido, acredita-se que o desemparelhamento de elétrons possa determinar uma atração para um campo magnético, responsável pela alta reatividade, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, como proteínas, lipídios e DNA, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons, ou seja, reagem com outras moléculas contra as quais colidem, retirando elétrons desta substância, modificando suas estruturas moleculares (KENYON, 2010; KUMAR et al., 2012).

Os Radicais Livres podem ter origem exógena ou endógena, estando às fontes endógenas relacionadas com o processo de respiração celular, como é possível visualizar na imagem da figura 2.

**Figura 2.** Reação da formação de espécies reativas de oxigênio

Fonte: Augusto (2006).



Durante o processo de respiração celular, estima-se que 95% do oxigênio que é consumido, segue até a cadeia do citocromo mitocondrial para formar energia e água. Os outros 5% são metabolizados na forma de espécies reativas de oxigênio: radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). Dentre estas substâncias, a mais reativa é o radical hidroxila, podendo causar lesão da membrana



lipoprotéica e em componentes celulares, através do processo de peroxidação lipídica, alteração da permeabilidade vascular, alteração da estrutura de proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, alterações oxidativas em moléculas de longa duração, como a elastina e o colágeno (FREITAS; MAGALHÃES, 2011; MOTA; FIGUEIREDO; DUARTE, 2004; MUÑOZ et al., 2012).

O organismo humano possui defesas antioxidantes eficientes, incluindo enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase e glutathiona redutase (RISTOW; SCHMEISSER, 2011). É provável, no entanto, que os erros na síntese de enzimas contribuam para aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, assim, estas reservas endógenas antioxidantes tornaram-se insuficientes de evitar os danos celulares (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011).

Neste sentido, se os radicais primários não forem desativados imediatamente por enzimas ou moléculas antioxidantes, surgirão danos biológicos nas macromoléculas. Este acúmulo de danos, com o passar da idade nas células e tecidos, é resultante do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, ou de uma diminuição da capacidade antioxidante e na velocidade de remoção e reparação das mesmas (HARMAN, 1988; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

À medida em que ocorre o envelhecimento, há um declínio nos mecanismos normais de defesa antioxidante que tornam o cérebro mais vulnerável aos efeitos deletérios, como resultado da oxidação. O estresse oxidativo e a inflamação são também conhecidos como principais contribuidores para as doenças neurodegenerativas (KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011; KUMAR et al., 2012).

Portanto, o estresse oxidativo é um fenômeno causado pela exposição e o acúmulo de toxinas geradas por fatores extrínsecos e intrínsecos sejam esses, fatores ambientais, fatores de radiação, agentes químicos e tóxicos, poluentes, tabagismo, alcoolismo, dieta desequilibrada, que conduzem à oxidação de biomoléculas com perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra as células. O cérebro, que rege o organismo como um todo, por utilizar grandes concentrações de oxigênio para manutenção e equilíbrio dos

sistemas, está muito vulnerável ao estresse oxidativo, sendo um fator de risco para as patologias neurodegenerativas (COUNE et al., 2013; MARQUES; OUTEIRO, 2012; TERAOKA et al., 2012).

O envolvimento da proteína alfa-sinucleína com o estresse oxidativo, já está estabelecido, no entanto, ainda é necessário elucidar se há uma relação com capacidade de ligação à membrana celular e se a toxicidade da alfa-sinucleína é um resultado da oxidação da dopamina, ou vice-versa, fazendo-se necessário maiores pesquisas (EISBACH; OUTEIRO, 2013; MUÑOZ et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo são estabelecidos por meio de análises laboratoriais que respondem aos marcadores de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Um dos principais mecanismos de lesão causada pelo estresse oxidativo como resultado da geração de radicais livres é a oxidação da camada lipídica da membrana celular, a lipoperoxidação. Este processo provoca alterações estruturais e funcionais da membrana, que prejudicam o metabolismo, refletindo principalmente, na sua perda de integridade, permeabilidade e fluidez, podendo levar à morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SAMPAIO; MORAES, 2010; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994).

Os produtos resultantes da peroxidação lipídica são parâmetros importantes para o monitoramento do dano causado pelas espécies reativas de oxigênio nos lipídeos. E por serem instáveis se degradam em produtos secundários que são chamadas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o qual promove informação significativa sobre as avaliações. Os níveis destas substâncias são utilizados como marcadores da peroxidação lipídica nos estados de estresse oxidativo elevados (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; YILDIRIM et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagada por radicais peroxilas. Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído, 4-hidroxinonal e isoprostanos, que podem ser detectados e utilizados para se avaliar o estresse oxidativo

(GAY et al., 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HSIEH; KINSELLA, 1989; JIANG; WOOLLARD; WOLF, 1991).

Dentre as defesas enzimáticas responsáveis pela proteção dos sistemas biológicos, encontra-se a enzima superóxido dismutase (SOD). A atividade desta enzima foi descrita pela primeira vez por McCord e Fridovich (1969). A atividade da superóxido dismutase pelo sistema de detecção adrenalina-citocromo está baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina (SOUTHORN; POWIS, 1988; BOVERIS et al., 1983).

A catalase, conhecida como uma enzima intracelular encontrada na maioria dos organismos decompõe o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esta enzima encontra-se no citoplasma de procariontes (NELSON; KIESOW, 1972). A decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase pode ser acompanhada pelo decréscimo de absorvância, sendo que a diferença da absorvância por unidade de tempo é usada para medir a atividade da catalase, o que permite analisar o efeito protetor de compostos aos danos causados pelo estresse oxidativo sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidante natural do modelo experimental.

Parâmetros considerados para análise de Viabilidade celular, também medem os danos oxidativos, isto ocorre pela medida da sobrevivência celular frente à expressões citotóxicas. As análises realizadas nestes tipos de sistemas são rápidas e permitem a utilização de células com as variadas características genéticas. Por estas razões a levedura *Saccharomyces cerevisiae* torna-se um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo (GUARIENTI et al., 2010; SOARES et al., 2005).

## **6.7. Antioxidantes como substâncias funcionais na terapêutica da Doença de Parkinson**

Os antioxidantes se caracterizam como agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Mesmo presentes em

baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, os antioxidantes tem o poder de inibir as taxas de oxidação, impedindo o ataque das espécies reativas de oxigênio sobre os lipídeos, aminoácidos e as bases do DNA, evitando assim a perda da integridade celular (LÜ et al., 2010; ROCHA et al., 2007). Antioxidantes são substâncias moleculares que neutralizam radicais livres, aceitando ou doando elétrons para eliminar a condição desemparelhada do radical. Os antioxidantes atuam em variados níveis na proteção dos organismos, sendo que o primeiro mecanismo de defesa é impedir a formação dos radicais livres, ou destruí-las (HARMAN, 1988).

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes tanto no organismo quanto em componentes naturais. O sistema enzimático, é composto por enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (LÜ et al., 2010). O sistema de defesa antioxidante não enzimático inclui as moléculas que interagem com as espécies radiculares consumidas durante a reação. O processo de reparo das lesões está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como compostos fenólicos e pigmentos (ALFIERI; LEUNG; GRACE, 1998; GUARIENTI et al., 2010; BIACHI; ANTUNES, 1999).

O equilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e os agentes óxido-redutores é de essencial importância, devido o perigo que o oxigênio apresenta aos seres vivos, visto que, os organismos aeróbios sobrevivem à sua presença somente por possuírem defesas antioxidantes. Os agentes óxido-redutores 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<sub>2</sub> (SILVA et al., 2012). 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 (RISTOW; SCHMEISSER, 2011; TRACHOOTHAM et al., 2008).

Existem possibilidades frente aos antioxidantes em manter o controle da doença de Parkinson, visto que a cura para esta patologia ainda não é totalmente conhecida pela

ciência. A busca pela terapia a base de antioxidante seria capaz de controlar a taxa de progressão e corrigir alterações de aspectos múltiplos da proteína alfa-sinucleína, a fim de fornecer soluções antioxidantes de controle da doenças para os pacientes que sofrem de distúrbios neurológicos devastadores (YASUDA; NAKATA; MOCHIZUKI, 2012).

Alguns estudos tem demonstrado que os compostos antioxidante são capazes de proteger as células neuronais por meio da eliminação dos radicais livres e ativação dos mecanismos de defesa antioxidantes. Além disso, a terapêutica de associação, com os antioxidantes e as drogas existentes pode ser benéfica e melhorar a eficácia da terapia padrão para o tratamento da doença de Parkinson (MARQUES; OUTEIRO, 2012; VENDEROVA; PARK, 2012).

A suplementação a base de antioxidantes, contando com múltiplos agentes cada um especificamente dirigido a um aspecto da doença degenerativa no tempo e dosagem adequados, pode gerar resultados promissores no controle destas patologias. Deste modo, espera-se encontrar respostas promissoras advindas de antioxidantes naturais para manter o controle da doença de Parkinson (ARON; TSVETKOV; FINKBEINER, 2013; COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011).

## **6.8. *Spirulina platensis* e a Ficocianina como substância funcional na terapia da Doença de Parkinson**

As cianobactérias são organismos fotossintetizantes com mecanismos fisiológicos e biomoleculares fortemente desenvolvidos para defesa contra espécies reativas de oxigênio, uma vez que as membranas fotossintéticas são alvo primário para os efeitos deletérios oxidativos. Por essa razão, esses organismos podem representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais tanto para a indústria alimentícia como para a área farmacêutica (BACHSTETTER et al., 2010; BERMEJO-BESCÓS; PIÑERO-ESTRADA; FRESNO, 2008; ZHOU et al., 2013).

A *Spirulina platensis* habita em águas alcalinas, salobras, marinhas e doces. Por meio da fotossíntese, converte os nutrientes em matéria celular e libera oxigênio. Os

primeiros relatos do uso da *Spirulina platensis* datam da pré-história, a partir da informação de que tribos de caçadores coletavam massas gelatinosas de algas verde-azuladas e as consumiam cruas ou cozidas (BACHSTETTER et al., 2010; CHEONG et al., 2010).

A microalga *Spirulina platensis* é legalmente autorizada como complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo FDA, que recentemente, emitiu o primeiro certificado Generally Recognized as Safe (GRAS) para a Spirulina, deliberando o seu uso como alimento sem apresentar risco à saúde. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconheceu a Spirulina como composto utilizado nas formulações de alimentos (ZHOU et al., 2013).

As cianobactérias possuem específicos pigmentos, dentre eles, carotenoides, clorofila e biliproteínas, os quais conferem diferentes propriedades funcionais. A *Spirulina platensis* tem como seu principal pigmento a ficobiliproteína, ficocianina (BOUSSIBA; RICHMOND, 1979; CHEONG et al., 2010; GUARIENTI et al., 2010).

A ficocianina é conhecido por ser o principal componente do extrato aquoso de *Spirulina platensis*, possui características importantes por ser uma proteína natural, de cor azul única, é solúvel em água, possui alta estabilidade com pH 5-7, propriedades terapêuticas e atividade antioxidante e anti-inflamatória, além de uma promissora aplicação em diagnósticos devido propriedades fluorescentes que possibilitam a utilização em ensaios imunológicos (DENG; CHOW, 2011).

Para tal, a ficocianina apresenta-se como estimulante do sistema imunológico (CHEONG et al., 2010). Em muitos países, o pigmento é usado como suplemento na alimentação e na farmacologia, devido ao seu potencial nutracêutico, anti-inflamatório e antibacteriano (BERTOLIN et al., 2009; COLLA; BAISH; COSTA, 2008; COSTA et al., 2005). O extrato da microalga é também utilizado como antioxidante e anti-estressor do sistema nervoso, pois atua diminuindo a patogenicidade de doenças neurodegenerativas neurológicas ativando a microglia, além de exibir um efeito preventor sobre infecções virais (GUARIENTI et al., 2010; ZHOU et al., 2013).

Estudo realizado por Bermejo et al. (2008), revelou que a ficocianina, pode ter papel antioxidante importante na atividade neuroprotetora, no entanto, ainda não se tem exata comprovação deste potencial. Estudos anteriores realizados por este grupo de cientistas mostraram que o extrato proteico de *Spirulina platensis* é um potente destruidor de radicais livres, devido a sua capacidade quelante e inibitória sobre a peroxidação lipídica micro-somal.

Ainda são poucos os estudos que relacionam a utilização da terapia através do extrato de *Spirulina platensis* mais precisamente com a ficocianina com a finalidade de proporcionar uma redução da neurotoxicidade causada pela agregação da alfa-sinucleína, e o conseqüente aumento da longevidade, especialmente com a utilização de modelo experimental *Saccharomyces cerevisiae* (BACHSTETTER et al., 2010; PABÓN, 2011). Neste sentido, a busca por tratamentos terapêuticos destinados a retardar o aparecimento e a progressão destas patologias, se fazem necessários, de maneira que nenhuma terapia bem sucedida foi ainda desenvolvida para aliviar e controlar efetivamente essas doenças.

## **6.9. Levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental**

A última década assistiu avanços fundamentais para a compreensão do processo de envelhecimento elevando o otimismo de que as intervenções para retardá-lo bem como suas conseqüentes doenças neurodegenerativas podem estar ao nosso alcance. Fatores que abrangem a longevidade têm sido mostrados para modular o envelhecimento em modelos de estudos como invertebrados e mamíferos, no entanto, estudos com o modelo levedura trouxeram imensas contribuições para este progresso. As primeiras intervenções para retardar as doenças neurodegenerativas decorrentes do envelhecimento humano podem surgir a partir da humilde levedura (KAEBERLEIN, 2010).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo unicelular, eucariótico, de ocorrência no solo, na água, nos vegetais, nos insetos, animais e no homem, tendo sua disseminação espalhada pelo vento. Estes microrganismos se reproduzem por sucessivas divisões mitóticas através de brotamento das células filhas, sempre clones da célula mãe, ou ainda por reprodução sexuada quando submetidas a condições ambientais especiais (MANNARINO et al., 2010; TENREIRO et al., 2013). Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica, dependentes da respiração mitocondrial para manter a viabilidade (KAEBERLEIN, 2010; RALSER; MICHEL; BREITENBACH, 2012).

A levedura e as demais espécies fúngicas apresentam um papel fundamental para se compreender a biologia básica do envelhecimento. O modelo de estudo levedura *Saccharomyces cerevisiae*, representa um dos mais importantes modelos experimentais usados em pesquisas sobre o envelhecimento. Em comparação com outros sistemas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* permite quantificar a longevidade e avaliar a atividade antioxidante de compostos de forma rápida, econômica e reprodutível, devido seu fenômeno de brotamento, bem como o que tem permitido definir os mecanismos moleculares de envelhecimento neste organismo (KAEBERLEIN, 2010; KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011).

O envelhecimento celular nas leveduras se distingue entre envelhecimento replicativo e envelhecimento cronológico. Sendo que o replicativo, também chamado de envelhecimento específico, descreve a quantidade de ciclos celulares de que uma célula de levedura conclui antes da senescência, ou em outras palavras, quantos brotamentos surgem de cada célula mãe (KUMAR et al., 2012; MORTIMER; JOHNSTON, 1959). O envelhecimento cronológico, é definido pelo tempo em que uma cultura de levedura perdura a 4 ° C (FABRIZIO; LONGO, 2003; POSTMA et al., 2009). Ambos dependem da rede metabólica, no entanto, o envelhecimento replicativo apresenta mecanismos homólogos de envelhecimento ao dos seres humanos (LAUN et al., 2006; RALSER; MICHEL; BREITENBACH, 2012).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo apresenta a facilidade na obtenção de mutações genéticas e moleculares, devido ao conhecimento de



seu genoma. O fácil cultivo em meio de cultura, além de curto tempo de geração quando comparado com as células animais também é um ponto positivo na utilização deste modelo eucariótico (DENG; CHOW, 2011; MANNARINO et al., 2010).

Apesar da diferença fisiológica entre a levedura e o ser humano, o estudo de envelhecimento e suas patologias neurodegenerativas, por meio deste modelo experimental tem proporcionado as introspecções chave abrindo caminhos que modulam o envelhecimento patológico no ser humano (TENREIRO; OUTEIRO, 2010).

Sampaio-Marques et al. (2012), afirmam que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* se mostra como poderoso modelo na busca para esclarecer diferentes aspectos moleculares associados ao efeito citotóxico da alfa-sinucleína, devido a vantagem de ser um sistema estabelecido com mecanismos de envelhecimento e mantendo uma conservação ao nível molecular básico.

Estudos recentes têm demonstrado que quando ocorre a mutação para expressão alfa-sinucleína em *Saccharomyces cerevisiae*, esta expressão se dá na membrana plasmática e forma inclusões. A expressão de alfa-sinucleína em leveduras também foi mostrada para inibir o crescimento, provocar o acúmulo de gotículas lipídicas, alterar tráfego de vesículas e o aumento de espécies reativas de oxigênio (OUTEIRO; LINDQUIST, 2003).

Os estudos em células eucarióticas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* possibilitam a compreensão dos mecanismos moleculares do envelhecimento pela identificação de fatores que modificam o aumento da longevidade. Sendo um organismo simples e de reduzida complexidade, com vantagens genéticas incluindo um genoma completamente sequenciado (HOWITZ et al., 2003; KAEBERLEIN, 2010; MANNARINO et al., 2010).

Devido as leveduras terem provado ser um modelo valioso para pesquisas da doença de Parkinson, surgiram as mutações genéticas no organismo *Saccharomyces cerevisiae*, que vieram com a intenção de assumir as propriedades da proteína parkinsoniana. Sendo assim, surpreendentemente a inserção genética de alfa-sinucleína em leveduras foi identificada e muitos destes agrupamentos de genes estão relacionados

com o metabolismo de lipídios e transporte vesicular, podendo através da indução do estresse oxidativo dar início a formação dos agregados e liberação da toxicidade de alfa-sinucleína (EISBACH; OUTEIRO, 2013; OUTEIRO; LINDQUIST, 2003; WILLINGHAM et al., 2003).

Neste sentido, a levedura é um modelo experimental que proporciona a possibilidades de manipulações com mutações genéticas. Além da expressão para a proteína parkinsoniana, a levedura também proporciona manipulações genéticas através da inserção ou deleção dos genes da enzima Sirtuína, que inclui a SIR1, SIR2, SIR3, SIR4, SIR5, SIR6 e SIR7 (RALSER; MICHEL; BREITENBACH, 2012), possibilitando investigações frente às abordagens dos mecanismos que envolvem as doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (BÜTTNER et al., 2010; SAMPAIO-MARQUES et al., 2012).

## **6.10 Sirtuínas – SIR2**

Sirtuínas são proteínas desacetilizadoras de histonas, dependentes da coenzima NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) portanto, NAD-dependentes, que codificam os genes da longevidade, e estão relacionadas com mecanismos de sobrevivência celular (PAIS et al., 2013). As sirtuínas aumentam a estabilidade do genoma através de processos de reparação, silenciamento genético e manutenção dos telômeros e são ativadas quando ocorre o aumento nos níveis de estresse oxidativo, impedindo danos no genoma e fazendo papel de proteção (DONMEZ et al., 2012).

As sirtuínas desempenham diversas funções como a regulação do tempo de vida, reparo de danos no DNA, resistência celular ao estresse e regulação metabólica. Atuam também sobre vários substratos importantes, dentre eles destacando a proteína p53 (relacionada a apoptose celular), fatores de transcrição, relacionado à resposta celular ao estresse e carcinogênese, bem como relacionadas ao metabolismo lipídico e à gliconeogênese, entre outros com funções relacionadas ao desenvolvimento de doenças ligadas ao envelhecimento (RALSER; MICHEL; BREITENBACH, 2012; SEBASTIÁN et al., 2012).

As sirtuínas foram inicialmente isoladas do modelo levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em estudos sobre envelhecimento realizados por Sinclair e Guarente em 1997. Visto que, organismos como bactérias codificam apenas uma sirtuína, os eucariotos possuem múltiplas sirtuínas, como no caso das leveduras que contém quatro (SIR1, SIR2, SIR3, SIR4). Em mamíferos é constituído por sete membros (SIR1, SIR2, SIR3, SIR4, SIR5, SIR6, SIR7), e diferenciam-se quanto á função e localização celular. A SIR1 em humanos é homóloga a SIR2 em leveduras, proporcionando assim estudos de envelhecimento fidedignos neste modelo experimental (ALBANI; POLITO; BATELLI, et al., 2009; DONMEZ et al., 2012).

Estima-se que as sirtuínas possuem a capacidade de bloquear alguns processos patológicos que podem contribuir para a lesão neuronal, incluindo a agregação e acúmulo de proteínas, bem como, o envolvimento sobre as vias de morte celular e disfunção mitocondrial. Neste contexto, pesquisas vem sendo realizadas com intuito de descobrir ativadores e repressores de sirtuínas que são de grande interesse para a ciência por atuarem na proteção dos neurônios e na repressão de respostas inflamatórias patogênicas das células gliais, via ativação ou inibição das sirtuínas. Assim, acredita-se que as sirtuínas podem fornecer caminhos para controlar ou retardar o envelhecimento e as doenças neurodegenerativas (HOWITZ et al., 2003; KAEBERLEIN, 2010; RALSER; MICHEL; BREITENBACH, 2012).

Estudos revelam que a SIR1 pode regular a proteção celular contra o estresse oxidativo, em muitas doenças relacionadas ao envelhecimento (DONMEZ; GUARENTE, 2010) Alguns estudos sugerem que a ativação da SIR1 pode ser uma via para o tratamento da doença de Parkinson em virtude dos seus efeitos de proteção celular (DONMEZ et al., 2012).

A SIR2 foi a primeira proteína sirtuína descrita por atuar no prolongamento da vida. Esta sirtuína vem recebendo enorme destaque nos últimos anos devido seu envolvimento em diversas funções fisiológicas, no metabolismo, envelhecimento e doenças relacionadas á idade (ALBANI; POLITO; BATELI, et al., 2009; KAZANTSEV; OUTEIRO, 2012; OLIVEIRA et al., 2012). Neste sentido, a SIR2 como potencial determinante da longevidade, é capaz de regular o processo de

envelhecimento em leveduras, sendo que a deleção do gene SIR2 diminui a vida útil da levedura em contraste com a superexpressão de SIR2 que estende o tempo de vida (RALSER; MICHEL; BREITENBACH, 2012).

Estudos relacionados a longevidade apontam que as sirtuínas foram identificadas como reguladores positivos do tempo de vida, protegendo sistemas mamíferos do envelhecimento, porém, bloqueando a longevidade anormal em casos específicos em modelo leveduras e plasmídios (HONJOH e NISHIDA, 2011).

Segundo Outeiro e seus colaboradores (2007) a inibição da SIR2 em células neuronais humanas também pode fornecer um caminho para intervenção na doença de Parkinson. No entanto, a deleção do gene SIR2 pode resultar na diminuição do acúmulo de alfa-sinucleína nas estruturas dos corpos de Lewy, com menor perda de neurônios dopaminérgicos, protegendo os neurônios da morte celular.

Assim, a SIR2 pode representar um forte alvo para terapias onde a agregação de proteínas é dominante na patogênese da doença. Esses autores indicam que estudos futuros devem ser realizados a fim de elucidar o efeito protetor da SIR2 nas doenças neurodegenerativas e desvendar o paradoxo das propriedades neuroprotetoras das sirtuínas, já que a ativação de SIR1 e a deleção de SIR2 parecem promover efeitos neuroprotetores (JADIYA et al., 2011; LORES-ARNAIZ; BUSTAMANTE, 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

Sendo assim, diferentes autores sugerem que a modulação das sirtuínas seja no futuro, um possível caminho para mimetizar os efeitos do envelhecimento que causam patologias neurodegenerativas decorrentes dos danos causados pelo estresse oxidativo (ALBANI et al., 2009; OUTEIRO; MARQUES; KAZANTSEV, 2008; WEBSTER et al., 2012; PAIS et al., 2013).

## **7 Hipótese**

A utilização da ficocianina pode ter efeito neuroprotetor frente á toxicidade da proteína alfa-sinucleína e na deleção do gene SIR2 no modelo levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido a suas propriedades antioxidantes.

## 8 Metodologia

### 8.1. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo quantitativo experimental. Os procedimentos experimentais foram realizados com o modelo levedura, conhecido como *Saccharomyces cerevisiae*. A partir do modelo levedura foram utilizadas 4 cepas, a cepa controle (BY4741-025), a cepa controle com mutação genética para a expressão da proteína alfa-synucleína (BY4741-140), a cepa com deleção ao gene SIR2 (SIR2-025) e a cepa com deleção ao gene SIR2 com mutação genética para a expressão da proteína alfa-synucleína (SIR2-140). A partir destas células foram realizadas análises laboratoriais com parâmetros para a avaliação dos níveis de estresse oxidativo com e sem tratamento de ficocianina, que é a substância funcional em estudo, a fim de analisar o efeito neuroprotetor e antioxidante deste composto nas células. Os procedimentos foram realizados no período de Janeiro de 2014 à Novembro de 2014.

O delineamento experimental será realizado conforme apresentado na Tabela 1. Todas as análises serão realizadas em triplicata.

**Tabela 1:** Delineamento experimental para análise do efeito protetor de ficocianina frente á toxicidade de alfa-sinucleína e á deleção do gene SIR2 nos cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*.

<b>Cultivos</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Cepas</b>
01	EMPTY-CONTROLE	BY4741 – 025
02	EMPTY-CONTROLE ( $\alpha$ Syn)	BY4741 – 140
03	$\Delta$ SIR2	$\Delta$ SIR2 – 025
04	$\Delta$ SIR2 ( $\alpha$ Syn)	$\Delta$ SIR2 – 140
05	EMPTY-CONTROLE + Ficocianina	BY4741 – 025 F
06	EMPTY-CONTROLE ( $\alpha$ Syn) + Ficocianina	BY4741 – 140 F
07	$\Delta$ SIR2 + Ficocianina	$\Delta$ SIR2 – 025 F
08	$\Delta$ SIR2 ( $\alpha$ Syn) + Ficocianina	$\Delta$ SIR2 – 140 F

Legenda: ( $\alpha$ Syn): alfa-synucleína; (0): sem expressão para alfa-sinucleína; (140): com expressão para alfa-sinucleína ( $\Delta$ SIR2): deleção do gene SIR2.

## 8.2. Local do experimento

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo.

## 8.3. Materiais e métodos

### 8.3.1. Modelo Experimental

Cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas como modelo experimental, sendo provenientes da Euroscarf, Frankfurt/Germany. A Tabela 2 apresenta as linhagens utilizadas nos experimentos.

**Tabela 2:** Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em estudo

<b>Cepas</b>	<b>Genótipos</b>
Luana Taís Hartmann Backes	ppgEH

BY 4717- 025	EMPTY
BY4741- 140	EMPTY ( $\alpha$ Syn)
SIR2- 025	$\Delta$ SIR2
SIR2-140	$\Delta$ SIR2 ( $\alpha$ Syn)

Ressaltamos a importância de que as devidas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em estudos, passaram anteriormente por manipulações genéticas. As células sofreram mutações para expressão de alfa-synucleína, o que faz com que não seja necessário a indução de estresse oxidativo por meio de elementos químicos, acentuando os níveis de estresse oxidativo nas próprias células da levedura, tornando-a um modelo estressor, induzido pela toxicidade (EISBACH; OUTEIRO, 2013). Desta forma, é possível a quantificação dos níveis de proteção da ficocianina contra a citotoxicidade de alfa-synucleína (MANNARINO et al., 2010; TENREIRO et al., 2013)

### 8.3.2. Meios de Cultura e Condições de cultivo para o crescimento celular

As linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram mantidas em Placas de Petry com meio de cultivo Yeast Peptone Dextrose (YPD) sólido, sob refrigeração a 4 °C. A manutenção das cepas foi realizada através de repiques periódicos em meio YPD, aproximadamente a cada 20 dias.

Para a obtenção dos cultivos foram utilizados dois diferentes meios de cultura líquidos durante as etapas dos processos. O cultivo e crescimento celular se dá em três processos distintos.

Primeiramente foi realizado o processo de pré-inóculo em tubo falcon de 15 ml contendo 3 ml do Meio SC-ura RAF 1%. Foi pré-inoculada uma alçada de levedura, e colocada em estufa shaker a 30 °C em 200 rpm de rotação por 24 horas. Após este período realizou-se a leitura da densidade óptica a 600nm onde esperava-se uma absorbância em torno de O.D. 0,8 Abs, afim de proceder com o cálculo para a obtenção da alíquota de células a ser inoculada.

$$V = \frac{0,003 \times 3}{OD \times 1000} \quad (1)$$

Onde:

V = volume da amostra

OD = densidade óptica do Branco menos a Densidade óptica obtida multiplicada por 2

0,003 = OD esperada dividido pelo exponencial do número de gerações celular obtido através do tempo de crescimento celular dividido pelo tempo de duplicação celular

3 = quantidade de Meio SC-ura RAF 1% (ml)

1000 = diluição realizada para medir a absorbância.

O processo de inoculação. Retirou-se do tubo a quantidade de levedura determinada pelo cálculo. Esta quantidade foi inoculada em tubo falcon de 50 ml contendo 10 ml de Meio SC-ura RAF 1%, e armazenada em estufa shaker a 30 °C a 200 rpm de rotação, por 24 horas. Após este período realizou-se a leitura da densidade óptica a 600nm, onde esperava-se uma absorbância em torno de O.D. 0,8 Abs, a fim de proceder com o cálculo para a obtenção da alíquota de células para o processo de indução.

$$V = \frac{0,02 \times 10}{OD} \quad (2)$$

Onde:

V = volume da amostra

OD = densidade óptica do Branco menos a Densidade óptica obtida multiplicada por 2

0,02 = OD esperada dividido pelo exponencial do número de gerações celular obtido através do tempo de crescimento celular dividido pelo tempo de duplicação celular

10 = quantidade de Meio SC-ura RAF 1% (ml)

O processo de indução foi realizado em tubo falcon de 50 ml contendo 10 ml de Meio SC-ura Gal, com e sem tratamento de ficocianina. Nesta fase, as células crescidas em YPD 2 % alcançando a primeira fase exponencial de crescimento, e apresentam um



metabolismo fermentativo, utilizando a glicose presente no meio como única fonte de carbono e não dependendo do oxigênio como aceptor final dos elétrons, (MACEDO et al., 2014).

É neste momento que ocorre a indução do estresse oxidativo nas células, através do início da expressão da proteína alfa-synucleína contida no DNA das células em estudo, que são as cepas caracterizadas pelo final 140 em sua nomenclatura. Estas células passam a gerar quadros de toxicidade induzida pelo estresse oxidativo, o que torna nosso modelo um modelo estressor, sem haver a necessidade da aplicação de elementos químicos, como o Ferro, por exemplo.

Neste processo é também aplicado o tratamento da substância em estudo, a ficocianina, que será descrito posteriormente, a fim de modular os níveis de estresse oxidativos causados pela alfa-synucleína. As células com tratamento de ficocianina foram induzidas em 10 ml de Meio SC-ura Gal e acrescidas de 0,48mg/ml de tratamento. Ao mesmo tempo as células sem tratamento, foram induzidas em 10 ml de Meio SC-ura Gal, armazenadas em estufa shaker a 30 °C em 200 rpm de rotação por 16 horas. Após este período, realizou-se a leitura da densidade óptica em 600nm onde era esperada uma absorbância em torno de O.D. 0,2 Abs para proceder com o cálculo de obtenção da alíquota de células que teríamos para proceder as análises. Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar a fim de evitar qualquer tipo de contaminação em nossas amostras.

A Tabela 3 representa o meio de cultura YPD utilizado para a manutenção das leveduras. As Tabelas 4 e 5 apresentam os meios de cultivos que foram utilizados nos processos de crescimento das leveduras para obtenção do pré-inóculo, inóculo e indução dos cultivos.

**Tabela 3:** Componentes do meio de cultivo - Meio YPD

<b>Componentes</b>	<b>(g) para 400mL</b>
Glicose	8

Peptona	4
Agar bacteriológico	12
Extrato de levedura	8

**Tabela 4:** Componentes do meio de cultivo para a obtenção dos pré-inóculos e inóculos – Meio SC – URA Rafinose

Componentes	(g) para 400mL
Rafinose	4
YNB AAS	2,72
SC-URA	0,3086

**Tabela 5:** Componentes do meio de cultivo para a indução e condução dos ensaios experimentais - Meio SC – URA Galactose

Componentes	(g) para 400mL
Galactose	4
YNB AAS	2,72
SC-URA	0,3086

## 8.4. Metodologia analítica

### 8.4.1. Preparação do extrato proteico - Ficocianina

A ficocianina, extrato aquoso da *Spirulina platensis*, proveniente da Companhia de Parry Nutraceuticals Division - EID Parry (Índia), foi pesada e misturada ao Meio SC–URA Rafinose, diluída em uma concentração de 6 g do pó da microalga para cada 120 ml do meio, em tubo Erlenmeyer, em agitação por vórtex, até o conteúdo se dissolver totalmente tornando-se um líquido de cor azul única. A medida de concentração da ficocianina foi determinada e estabelecida através de testes realizados

pelo grupo de pesquisadores do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa, Portugal, onde afirmam que a quantidade de 6 g para cada 120 de meio, permite uma maior resposta das atividades antioxidantes da ficocianina, e em menores concentrações não seria possível obter resposta para estudos realizados com cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **8.4.2. Purificação da Ficocianina e aplicação do tratamento nas células de *Saccharomyces cerevisiae***

Em capela de fluxo laminar foi realizado o processo de filtração e esterilização do extrato ficocianina para aplicação do tratamento nas células de *Saccharomyces cerevisiae*. O processo de filtração estéril foi através de filtros de seringa do tipo Minisart RC20 com membranas de 0,2, que faz a remoção de microrganismos e partículas de líquidos, descartando todos interferentes, devido a absorção e decomposição de partículas. Para a esterilização e remoção das partículas de ar e outros gases, a filtração estéril proporciona a purificação de solventes aquosos orgânicos por meio de uma membranas hidrofílicas de celulose.

Para tal, foi necessário o uso de seringas, onde manualmente foi impulsionada uma alíquota de 3 ml por vez do líquido contendo o Meio SC-URA Rafinose com a ficocianina diluída, até alcançar a quantidade necessária para os tratamentos das células, que era de 10 ml de meio tratado.

#### **8.4.3. Análises experimentais**

##### **8.4.3.1. Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de TBARS**

Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidacao lipidica é a analise da formacao de substancias que reagem ao acido tiobarbiturico (TBARS). Esse

método consiste na análise dos produtos finais da peroxidacao lipidica (peroxidos lipidicos, malondialdeidos e demais aldeidos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o acido tiobarbiturico (TBA), formam bases de Schiff (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Tais complexos são coloridos e sua concentracao pode ser determinada espectrofotometricamente a 535nm, ou por fluorescencia a 515nm de excitacao e 555nm de emissão (NETO et al., 2008).

Inicialmente foram recolhidas por centrifugação 50 mg de células com e sem tratamento de ficocianina. As células foram lavadas duas vezes com água destilada gelada, resuspensas em 500 µL de TCA 10% (ácido tricloro acético) e transferidas para tubo de parede grossa. Foram adicionadas 1,5 g de pérolas de vidro para que ocorresse a lise celular através do rompimento da membrana plasmática, sob agitação vigorosa de 6 ciclos de 20 s no vórtex e 6 ciclos 20 s no gelo sucessivamente. O extrato foi recolhido em micro tubo e as pérolas de vidro foram lavadas com 500 µl de TCA 10% e o restante do estrato novamente foi recolhido, foi então centrifugado a 4000 rpm por um período de 4 minutos, onde o sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises de peroxidação lipídica através do método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (GAY et al., 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HSIEH; KINSELLA, 1989; JIANG; WOOLLARD; WOLF, 1991; SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994).

O ensaio foi realizado conforme descrito na Tabela 6.

**Tabela 6:** Composição das soluções para utilização na metodologia TBARS

	Branco	Amostras sem tratamento (mL)	Amostra com tratamento (mL)
Água destilada	0,3	-	-
EDTA 0,1 M	0,1	0,1	0,1
Extrato	-	0,3	0,3
Ac. Tiobarbitúrico 1% em NaOH 0,05 M	0,6	0,6	0,6

Volume total (mL)

1

1

1

---

A mistura reacional foi incubada a 100°C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e a absorvância medida espectrofotometricamente a 532nm, e o calculo da concentracao de TBARS, por meio de uma curva-padrao de tetraetoxipropano; os resultados foram expressos em nmol/mL de células.

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

Para realização do cálculo foi realizada o ensaio da Curva padrão de 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, onde, 0,02 nmol de TMP (STEELS; LEARMONTH; WATSON; 1994). A solução padrão foi utilizada para o preparo das diferentes concentrações de TMP (Tabela 7).

**Tabela 7:** Procedimento experimental para a confecção da curva com padrão TMP (1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano)

<b>Balão</b>	<b>Sol. Padrão (mL)</b>	<b>TCA 10 % (mL)</b>	<b>Concentração Sol. Padrão (nmol)</b>
Branco	0	50,0	0,00
1	0,025	49,0	0,08
2	0,050	48,0	0,16
3	0,075	46,0	0,32
4	0,100	44,0	0,48
5	0,125	43,0	0,56
6	0,150	42,0	0,64
7	0,175	41,0	0,72
8	0,200	39,0	0,88
9	0,225	38,0	0,96
10	0,250	36,0	1,12
11	0,275	35,0	1,20

Legenda: 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, para obter a medida da curva.

Os produtos resultantes da peroxidação lipídica são parâmetros importantes para o monitoramento do dano causado pelas espécies reativas de oxigênio nos lipídeos. E por serem instáveis se degradam em produtos secundários que são chamadas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o qual promove informação significativa sobre as avaliações. Os níveis destas substâncias são utilizados como

marcadores da peroxidação lipídica nos estados de estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2007).

#### **8.4.3.2. Dosagem da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)**

Dentre as defesas enzimáticas responsáveis pela proteção dos sistemas biológicos, encontra-se a enzima superóxido dismutase (SOD) que faz parte do sistema antioxidante natural de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) mede os níveis de toxicidade gerada pela expressão de alfa-sinucleína, baseada na inibição do radical superóxido com a adrenalina (SOUTHORN; POWIS, 1988), determinada através da velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM, pH 10) e adrenalina (1 mM). A superóxido dismutase presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Uma unidade de superóxido dismutase é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50 % a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de adrenocromo, e a atividade da superóxido dismutase é determinada medindo a sua velocidade de formação (BOVERIS et al., 1983).

Inicialmente, as células em estudo (3 ml) passaram pelo processo de duas lavagens com a mesma quantidade de tampão fosfato de sódio a um PH 7, á 6000 rpm durante 5 minutos. Após foi acrescentado 1,5 g de pérolas de vidro e 0,5 ml do tampão para o processo de lise celular, em 3 ciclos sucessivos de agitação em vórtex por 1 minuto e banho de gelo por 1 minuto e logo, centrifugado á 1500 rpm por 3 minutos. O conteúdo sobrenadante foi retirado e colocado em tubos de ensaio para o procedimento de. Todos os experimentos foram em triplicatas de três análises cada, para obter maior fidedignidade nos resultados.

Foi adicionado 1 mL de tampão glicina para zerar o espectrofotômetro. Foram adicionados 17 µl de adrenalina (concentração final na cubeta 1 mM) e iniciou-se a leitura a 480 nm. Para cada amostra foi adicionado 1 ml de tampão acrescentado de 17 µl de adrenalina e a adição das amostras era em três quantidades diferentes. Inicialmente eram adicionados 20 µl de amostra, depois 40 µl de amostra e depois 60 µl de amostra iniciando a leitura, este procedimento foi repetido três vezes para cada amostra, em triplicata, no total nove vezes, e cada procedimento com as três diferentes quantidades de amostra sendo iniciada a leitura em espectrofotômetro, e logo após fazia-se a lavagem da cubeta para proceder com a amostra seguinte. Gerava-se assim, uma planilha no próprio programa do espectrofotômetro, com nove gráficos de três diferentes concentrações para cada amostra (20 µl, 40 µl e 60 µl).

O cálculo foi realizado de acordo com as inclinações das retas obtidas e o log para cada amostra. O volume homogeneizado foi expresso por meio de gráfico e o log das amostras foi multiplicado pelo volume homogeneizado. A partir do gráfico, foi calculado quantos microlitros correspondem a inibição de 50 %. Os resultados foram expressos em unidades de SOD por mg de proteína.

$$[\text{SOD}] = 1000 / \mu\text{l correspondentes a } 1 \text{ U de SOD} \times \text{mg de proteína.}$$

Para realização do cálculo foi realizada o ensaio da Curva padrão de calibração que pode ser observada na Tabela 8.

**Tabela 8:** Procedimento experimental para a confecção da curva de calibração

<b>Tubo</b>	<b>Solução Padrão de albumina (µL)</b>	<b>Água milli-Q (µL)</b>	<b>Ratavo C (mL)</b>
<b>Branco</b>	0	200	1,0
<b>1</b>	10	190	1,0
<b>2</b>	20	180	1,0
<b>4</b>	40	160	1,0



---

6	60	140	1,0
8	80	120	1,0

---

Legenda: Reativo C = 50% Reativo A (NaOH) + 25% Reativo B1 (CuSO<sub>4</sub>) + 25% Reativo B2 (Tartarato de Na<sub>2</sub>K).

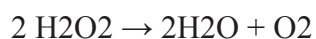
#### 8.4.3.3. Dosagem da atividade enzimática da Catalase (CAT)

A catalase, conhecida como uma enzima intracelular encontrada na maioria dos organismos decompõe o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esta enzima encontra-se no citoplasma de procariontes (NELSON; KIESOW, 1972). A decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase pode ser acompanhada pelo decréscimo de absorvância, sendo que a diferença da absorvância por unidade de tempo é usada para medir a atividade da catalase, o que permite analisar o efeito protetor do nosso composto em estudo, a ficocianina, frente à toxicidade de alfa-sinucleína na atividade enzimática do sistema natural de *Saccharomyces cerevisiae*.

A decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase pode ser acompanhada pelo decréscimo da absorvância em 240 nm (NELSON; KIESOW, 1972).

Inicialmente, o espectrofotômetro foi estabilizado e foi verificado o comprimento de onda (240 nm) para iniciar os testes lendo três vezes as quedas de absorvância das amostras em triplicatas. Em cubeta de quartzo no espectrofotômetro, a preparação da amostra iniciava-se com a adição de 2000 µl de tampão fosfato de potássio (TFK) 50 mM pH 7,0 e zerado. Posteriormente, a cubeta foi retirada e lavada com água destilada estéril e colocada novamente no espectrofotômetro. Em seguida foram acrescentados 1910 µl de tampão TFK 50 mM pH 7,0 e adicionados 20 µl da amostra diluída, foi homogeneizado e novamente zerado. Foi pipetado 70 µl de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na cubeta, e homogeneizado. Entre uma amostra e outra, foi retirado o tampão da cubeta e lavada, e acrescentado 1910 µl de tampão novamente. Nelson e Kiesow, 1972. A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o peróxido de hidrogênio é reduzido pela ação da enzima, provocando diminuição no valor da

absorbância em 240nm. A diferença na leitura das absorbâncias a 240nm, em determinado intervalo de tempo (15 segundos), permite estabelecer a velocidade de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que é proporcional a velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT (NETO et al., 2008).



O cálculo da atividade da CAT foi feito pela seguinte equação:  $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log a_1/a_2)$ , onde  $\Delta t$  é a variação do tempo de reação (15s),  $a$  é o volume de hemolisado na cubeta,  $b$  é a concentração da amostra em g/dL,  $a_1$  é o valor da absorbância no tempo zero ( $t = 0$ ) e  $a_2$  é o valor da absorbância no tempo final ( $t = 15$ s). A unidade final expressa-se em k/gHb/min.

Para realização do cálculo foi realizada o ensaio da Curva padrão de calibração que pode ser observada na Tabela 9.

**Tabela 9:** Procedimento experimental para a confecção da curva de calibração

<b>Tubo</b>	<b>Solução Padrão de albumina (µL)</b>	<b>Água milli-Q (µL)</b>	<b>Rativo C (mL)</b>
<b>Branco</b>	0	200	1,0
<b>1</b>	10	190	1,0
<b>2</b>	20	180	1,0
<b>4</b>	40	160	1,0
<b>6</b>	60	140	1,0
<b>8</b>	80	120	1,0

Legenda: Reativo C = 50% Reativo A (NaOH) + 25% Reativo B1 (CuSO<sub>4</sub>) + 25% Reativo B2 (Tartarato de Na<sub>2</sub>K).

#### 8.4.3.4. Dosagem da atividade enzimática da Glutathione (GSH)

A glutathione peroxidase oxida a glutathione reduzida (GSH), um tripeptídeo, na redução acoplada de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , como representado ( $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$ ). Esta enzima também pode atuar na redução de hidroperóxidos de ácidos graxos. Para a manutenção de um nível basal de GSH no organismo, a conversão de glutathione oxidada (GSSG) a GSH é catalisada pela enzima glutathione redutase, como representado ( $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$ ).

A análise de dosagem da atividade enzimática da glutathione GSH total é um processo enzimático sensível e específico. A glutathione é oxidada pelo ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) para dar glutathione oxidada com formação estequiométrica de 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB). A glutathione oxidada é reduzida pela taxa de formação de TNB e sua absorvância é lida em 412 nm, sendo proporcional à soma da GSH e da GSSG presentes. A glutathione desempenha um papel importante no processo metabólico da detoxificação eletrofílica sendo considerado um fiável índice de estressores oxidativos (ANDERSON, 1985; VANDEPUTTE, 1994; CLARKE, 1997)

Inicialmente foi pipetado uma quantidade equivalente a 2 ml da amostra em tubos de parede grossa e centrifugado á 2000 rpm por 10 minutos. Após foi retirado o sobrenadante e adicionado 1,3 ml de TCA 10% (ácido tri-cloro acético) para reagir e novamente centrifugado á 2000 rpm por 20 minutos, após foi retirado o sobrenadante. Foi adicionado neste sobrenadante, 130 µl de DTNB e homogeneizado, após foi feita a leitura da absorvância em 412 nm.

Para realização do cálculo foi realizada o ensaio da Curva padrão de Cisteína. A solução padrão foi utilizada para o preparo das diferentes concentrações de Cisteína (Tabela 10).

**Tabela 10:** Procedimento experimental para a confecção da curva com padrão Cisteína

Balão	H <sub>2</sub> O	Cisteína 0,5mM	TFK 0,05M pH 6,8	DTNB 10Mm
-------	------------------	----------------	------------------	-----------

	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )
<b>Branco</b>	1000	----	1000	50
<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	980	20	1000	50
<b>25 <math>\mu\text{M}</math></b>	950	50	1000	50
<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	900	100	1000	50
<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	800	200	1000	50
<b>130 <math>\mu\text{M}</math></b>	700	300	1000	50

Legenda: DTNB = ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico); TFK = tampão fosfato de potássio.

O cálculo final das amostras foi realizado a partir do cálculo da equação da reta. Foi multiplicado o resultado obtido por 6, pois devemos considerar que a amostra foi homogeneizada na razão de 2 ml amostra/3mL. O resultado final está  $\mu\text{M}$  ( $\mu\text{mol/L}$ ), foi passado para nmol/L (valor em  $\mu\text{M}$  multiplicado por 1000). Dividido o resultado pelo valor de proteínas (mg/L). Resultado final está em nmol/mg de proteína.

#### 8.4.3.5. Viabilidade celular por citometria de fluxo

Uma medida de dano oxidativo pode ser obtida pela medida da sobrevivência celular frente à expressões citotóxicas. Esta análise permitem a utilização de células com as variadas características genéticas. Por estas razões a levedura *Saccharomyces cerevisiae* torna-se um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo (GUARIENTI et al., 2010; SOARES et al., 2005).

A viabilidade celular foi determinada através da citometria de fluxo foi realizada em um equipamento FACSBDSLRS Fortessa, equipado com o BP 695/40 e a 685 LP. Observando que este ensaio foi realizado no Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa em Lisboa – Portugal, durante um estágio realizado na área da neurociência, no período de Maio a Junho de 2014.

Para analisar a viabilidade celular, as células de levedura foram incubadas com 5  $\mu\text{gml}^{-1}$  de iodeto de propídio (PI), durante 30 minutos ao abrigo da luz. Foi analisado o

comprometimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* representada pelas cepas controle (BY4741 - 0), cepa controle com mutação genética para a expressão da proteína Alfa-synucleína (BY4741 – 140), cepa com deleção ao gene SIR2 (SIR2 – 0) e a cepa com deleção ao gene SIR2 e mutação genética para a expressão da proteína Alfa-synucleína (SIR2 – 140), e as mesmas células com o tratamento de ficocianina. A análise dos dados foi realizada utilizando software FlowJo e a exclusão de doublets celulares foi realizada com base em parâmetros de dispersão -W Forward-A. Um mínimo de 10 000 eventos foram coletadas para cada experimento. Os resultados foram expressos como MFI (intensidade média de fluorescência) de uma molécula (MACEDO et al., 2014).

### 8.5. Análise estatística

Os resultados obtidos neste estudo representados como a média  $\pm$  DP de pelo menos três triplicatas, e foram avaliados por análise de variância ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa PASW Statistics 18.0.

## 9 Cronograma

A execução do projeto acontecerá no período março de 2013 á janeiro de 2014. O trabalho experimental ocorrerá entre os meses de março de 2014 a outubro de 2014. No Quadro 1 estão descritas as ações e atividades, bem como o período em que serão executadas.

**Quadro 1:** Cronograma de atividades previstas para o projeto

Ações e atividades	Período em Semestres			
Definir a problemática e questão de pesquisa	X	X		

Planejamento da pesquisa	X	X		
Atualização da literatura e Revisão Teórica	X	X	X	X
Testes preliminares e preparação dos meios de cultivo		X	X	
Qualificação do Projeto			X	
Procedimentos experimentais			X	X
Análise dos resultados e tratamento estatístico				X
Elaboração de artigos para publicação em periódicos da área				X
Defesa da Dissertação				X

## 10 Orçamento

Os materiais permanentes estão disponíveis no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo, não sendo necessária sua aquisição. O Quadro 2 apresenta o cronograma financeiro para a realização do presente projeto.

**Quadro 2:** Cronograma financeiro do presente projeto

Material de expediente	Orçamento
Meios de cultivos	3.500,00
Materiais de laboratório	2.000,00
Reagentes	4.000,00
TOTAL	10.500,00

## 11 Referências

ABOU-SLEIMAN, P. M.; MUQIT, M. M. K.; WOOD, N. W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature*, v. 7, n. 3, p. 207-219, doi:10.1038/nrn1868, 2006.

ALBANI, D.; POLITO, L.; BATELLI, S. et al. The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide. *Journal of Neurochemistry*, v. 110, n. 5, p. 1445-1456, doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06228.x, 2009.

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, doi:10.1007/BF02784038, 1998.

AMARAL, M. et al. The causative role and therapeutic potential of the kynurenine pathway in neurodegenerative disease. *Journal of Molecular Medicine*, v. 91, n. 6, p. 705-713, doi:10.1007/s00109-013-1046-9, 2013.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*, v. 113, p. 548-555, 1985.

ANGOT, E. et al. Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *Plos One*, v. 7, n. 6, p. 394-405, doi:10.1371/journal.pone.0039465, 2012.

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.

ARON, R.; TSVETKOV, A.; FINKBEINER, S. NUB1 snubs huntingtin toxicity. *Nature Neuroscience*, v. 16, n. 5, p. 523-525, doi:10.1038/nn.3380, 2013.

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

BACKES, L. T. H.; SCORTEGAGNA, S. A.; BERTOLIN, T. E. Doença de Parkinson, uma perda de identidade. In: DOBNER, T. (Orgs.). Doenças crônicas: controle e reabilitação. Passo Fundo: Berthier, 2013. p. 21-32.

BACHSTETTER, A. D. et al. Spirulina promotes stem cell genesis and protects against LPS induced declines in neural stem cell proliferation. *Plos One*, v. 5, n. 5, p. 496-507, doi:10.1371/journal.pone.0010496, 2010.

BENDOR, J. T.; LOGAN, T. P.; EDWARDS, R. H. The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*, v. 79, n. 6, p. 1044-1066, doi:10.1016/j.neuron.2013.09.004, 2013.

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

BERMEJO-BESCÓS, B. P.; PIÑERO-ESTRADA, E.; FRESNO, Á. M. V. Del. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro*, v. 22, n. 6, p. 1496-1502, doi:10.1016/j.tiv.2008.05.004, 2008.

BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Radicais livres e o processo de envelhecimento. In: PORTELLA, M. R. (Orgs.). Envelhecimento Humano saberes e fazeres. Passo Fundo: Editora UPF, 2006. p. 77-95.

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, n. 1, p. 1253-1259, 2009.

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



BEYER, K.; ARIZA, A. Alpha-synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 509-524, doi:10.1007/s12035-012-8330-5, 2012.

BHARADWAJ, P.; MARTINS, R.; MACREADIE, I. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*, v. 10, n. 8, 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.

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.

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 227, n. 2, p. 534-541, 1983.

BROADLEY, S. A.; HARTL, F. U. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 583, n. 16, p. 2647-2653, doi:10.1016/j.febslet.2009.04.029, 2009.

BUTLER, E. K. et al. The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates  $\alpha$ -Synuclein toxicity. *PLoS Genetics*, v. 8, n. 2, p. 1-15, doi:10.1371/journal.pgen.1002488, 2012.

BÜTTNER, S. et al. Synphilin-1 enhances  $\alpha$ -synuclein aggregation in yeast and contributes to cellular stress and cell death in a Sir2-dependent manner. *Plos One*, v. 5, n. 10, p. 1-17, doi:10.1371/journal.pone.0013700, 2010.

CALDINELLI, L.; ALBANI, D.; POLLEGIONI, L. One single method to produce native and Tat-fused recombinant human  $\alpha$ -synuclein in *Escherichia coli*. *Bio Med Central Biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 13-32, doi:10.1186/1472-6750-13-32, 2013.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Review*, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHEONG, S. H. et al. Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 56, n. 1, p. 34-40, 2010.

CLARKE, J. B. et al. Modification of an enzymatic glutathione assay for the microtiter plate and the determination of glutathione in rat primary cortical cells. *Toxicologic Method*, v. 6, p. 223-230, 1996.

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.

COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nature Neuroscience*, v. 12, n. 6, p. 359-366, doi:10.1038/nrn3039, 2011.

COOPER, A. A. et al. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, v. 313, n. 1, p. 324-328, 2006.

COSTA, J. A. V. et al. Purification of *Spirulina platensis* Phycocyanin. *Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard*, v. 14, n. 1, p. 63-64, 2005.

COUNE, P. G. et al. An in vivo ultrahigh field 14.1 T (1) H-MRS study on 6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein-based rat models of Parkinson's disease: GABA as an early disease marker. *NMR in Biomedicine*, v. 26, n. 1, p. 43-50, doi:10.1002/nbm.2817, 2013.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, v. 39, n. 11, p. 889-909, 2003.

DENG, R.; CHOW, T. J. Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina. *Cardiovascular Ther*, v. 28, n. 4, p. 33-45, doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x, 2010.

DETTMER, U. et al. In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of  $\alpha$ -synuclein and  $\beta$ -synuclein in neurons and non-neural cells. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 288, n. 9, p. 6371–6385, 2013.

DICKSON, D. W. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 2, n. 8, p. 1-15, doi:10.1101/cshperspect.a009258, 2012.

DIMANT, H.; EBRAHIMI-FAKHARI, D.; MCLEAN, P. J. Molecular chaperones and co-chaperones in Parkinson disease. *The Neuroscientist*, v. 18, n. 6, p. 589-601, doi:10.1177/1073858412441372, 2012.

DONMEZ, G. et al. SIRT1 protects against  $\alpha$ -synuclein aggregation by activating molecular chaperones. *The Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 1, p. 124-132, doi:10.1523/JNEUROSCI.3442-11.2012, 2012.

DONMEZ, G.; GUARENTE, L. Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell*, v. 9, n. 2, p. 285-290, doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00548.x, 2010.

EISBACH, S. E.; OUTEIRO, T. F. Alpha-synuclein and intracellular trafficking: impact on the spreading of Parkinson's disease pathology. *Journal of Molecular Medicine*, v. 91, n. 6, p. 693-703, doi:10.1007/s00109-013-1038-9, 2013.

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, n. 1, p. 1217-1223, 1995.

ESTEVEES, A. R. et al. Mitochondrial Dysfunction: The Road to Alpha-Synuclein Oligomerization in PD. *Parkinson's Disease*, v. 2011, n. 69, p. 1-20, doi:10.4061/2011/693761, 2011.

FABRIZIO, P.; LONGO, V. D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, v. 2, n. 1, p. 73-81, 2003.

FELLNER, L.; STEFANOVA, N. The role of glia in alpha-synucleinopathies. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 575-586, doi:10.1007/s12035-012-8340-3, 2012.

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

FREITAS, A. A.; MAGALHÃES, J. P. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutation Research*, v. 728, n. 1, p. 12-22, doi:10.1016/j.mrrev.2011.05.001, 2011.

GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Analytical Biochemistry*, v. 273, n. 1, p. 149-155, 1999.

GONÇALVES, S.; OUTEIRO, T. F. Assessing the subcellular dynamics of alpha-synuclein using photoactivation microscopy. *Molecular neurobiology*, v. 47, n. 3, p. 1081-1092, doi:10.1007/s12035-013-8406-x, 2013.

GRUDEN, M. A. et al. Correlation between protective immunity to  $\alpha$ -synuclein aggregates, oxidative stress and inflammation. *Neuroimmuno Modulation*, v. 19, n. 6, p. 334-342, doi:10.1159/000341400, 2012.

GUARIENTI, C. et al. Viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* frente à *Spirulina platensis*. *Revista Brasileira de Ciência em Envelhecimento Humano*, v. 7, n. 1, p. 144-150, doi:10.5335/rbceh.2010.056, 2010.

GUERRERO, E. et al. Recent advances in  $\alpha$ -synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 525-536, doi:10.1007/s12035-012-8328-z, 2013.

HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals. In: *Biology and Medicine*. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999. p. 936.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *The Journal of Gerontology*, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956.

HARMAN, D. The aging process. *Basic Life Sciences*, v. 49, n. 11, p. 1057-1065, 1988.

HONJOH, S.; NISHIDA, E. Two sides of lifespan regulating genes: pro-longevity or anti-longevity? *Journal of Biochemistry*, v. 149, n. 4, p. 381-388, doi:10.1093/jb/mvr026, 2011.

HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, v. 425, n. 11, p. 191-196, doi:10.1038/nature01965.1, 2003.

HSIEH, R. J.; KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. *Adv. Food Nutr. Res.*, v. 33, p. 233-341, 1989.

IMAI, Y.; LU, B. Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: disordered cellular power plant becomes a big deal in a major movement disorder. *Neurobiology of Disease*, v. 21, n. 6, p. 935-941, doi:10.1016/j.conb.2011.10.016, 2011.

JADIYA, P. et al. Sir-2.1 modulates "calorie-restriction-mediated" prevention of neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*: implications for Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 413, n. 2, p. 306-310, doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.092, 2011.

JIANG, Z.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

JIN, K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*, v. 1, n. 2, p. 72-74, 2010.

KAEBERLEIN, M. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*, v. 464, n. 7288, p. 513-519, doi:10.1038/nature08981, 2010.

KANAZAWA, T. et al. Pale neurites, premature  $\alpha$ -synuclein aggregates with centripetal extension from axon collaterals. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, v. 22, n. 1, p. 67-78, doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00509.x, 2012.

KARASOVA, J. Z. et al. Acetylcholinesterase inhibitors used or tested in Alzheimer 's disease therapy ; their passive diffusion through blood brain barrier: In vitro study. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 7, n. 22, p. 1471-1481, doi:10.5897/AJPP2013.2977, 2013.

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, doi:10.3389/fphar.2012.00071, 2012.

KENYON, C. J. The genetics of ageing. *Nature*, v. 464, n. 7288, p. 504-512, doi:10.1038/nature08980, 2010.

KHOLA, G.; B. GHAZALA. Biodiesel production from algae. *Pakistan Journal of Botany*, v. 44, n. 1, p. 379-381, 2012.

KIM, S. K. Common aging pathways in worms, flies, mice and humans. *The Journal of Experimental Biology*, v. 210, n. 9, p. 1607-1612, doi:10.1242/jeb.004887, 2007.

KIRKWOOD, T. B. L.; AUSTAD, S. N. Why do we age? *Nature*, v. 408, n. 9, p. 233-238, 2000.

KLEIN, C.; WESTENBERGER, A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 1, p. 1-15, doi:10.1101/cshperspect.a008888, 2012.

KOURTIS, N.; TAVERNARAKIS, N. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *The EMBO Journal*, v. 30, n. 13, p. 2520-2531, doi:10.1038/emboj.2011.162, 2011.

KUMAR, H. et al. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 8, p. 10478-10504, doi:10.3390/ijms130810478, 2012.

LASHUEL H. A. et al. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews Neurosciense*, v. 14, n. 1, p. 38-48, 2012.

LAUN, P. et al. Yeast as a model for chronological and reproductive aging—acomparison. *Experimental Gerontology*, v. 41, n. 12, p. 1208–1212, 2006.

LEE, Y.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Animal models of Parkinson's disease: vertebrate genetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 10, p. 1-20, a009324. doi:10.1101/cshperspect.a009324, 2012.

LI, L. et al. Genetic dissection of a mitochondria-vacuole signaling pathway in yeast reveals a link between chronic oxidative stress and vacuolar iron transport. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 14, p. 10232-10242, doi:10.1074/jbc.M109.096859, 2010.

LORES-ARNAIZ, S.; BUSTAMANTE, J. Age-related alterations in mitochondrial physiological parameters and nitric oxide production in synaptic and non-synaptic brain

cortex mitochondria. *Neuroscience*, v. 188, n. 1, p. 117-124, doi:10.1016/j.neuroscience.2011.04.060, 2011.

LÜ, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 14, n. 4, p. 840-860, doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x, 2010.

MACEDO, D. et al. (Poly)phenols protect from  $\alpha$ -synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy. *Human molecular genetics*, v. 24, n. 3, p. 1-16. doi:10.1093/hmg/ddu585. November, 2014.

MADEO, F.; TAVERNARAKIS, N.; KROEMER, G. Can autophagy promote longevity? *Nature Cell Biology*, v. 12, n. 9, p. 842-846, doi:10.1038/ncb0910-842, 2010.

MANNARINO, C. et al. Requirement of glutathione for Sod1 activation during. *Yeast*, v. 28, n. 1, p. 19-25, doi:10.1002/yea, 2010.

MARQUES, O.; OUTEIRO, T. F. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. *Cell Death & Disease*, v. 3, n. 7, p. 350-357, doi:10.1038/cddis.2012.94, 2012.

MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biology and Chemistry*, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MCCORMACK, A. L.; MAK, S. K.; MONTE, D. A. Di. Increased  $\alpha$ -synuclein phosphorylation and nitration in the aging primate substantia nigra. *Cell Death & Disease*, v. 3, n. 5, p. 315-324, doi:10.1038/cddis.2012.50, 2012.

MORTIMER, R. K.; JOHNSTON, J. R. Life span of individual yeast cells. *Nature* v. 183, n. 1, p. 1751-1752, 1959.



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.

MUÑOZ, P. et al. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinson's Disease*, v. 2012, n. 1, p. 1-13, doi:10.1155/2012/920953, 2012.

MUSGROVE, R. E. J.; KING, A. E.; DICKSON, T. C.  $\alpha$ -Synuclein protects neurons from apoptosis downstream of free-radical production through modulation of the MAPK signalling pathway. *Neurotoxicity Research*, v. 23, n. 4, p. 358-369, doi:10.1007/s12640-012-9352-5, 2012.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972.

NETO, J. M. F. A. et al. Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo Em Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: *Overreaching* Induzido por Treinamento de Natação e Câncer. *Revista Brasileira da Medicina do Esporte*, v. 14, n. 6, p. 548-552. Nov/Dez, 2008.

NOALE, M. et al. Longevity and health expectancy in an ageing society : implications for public health in Italy. *Annals Institut Super Sanità*, v. 48, n. 3, p. 292-299, doi:10.4415/Ann, 2012.

OLIVEIRA, R. M. et al. SIRT2 as a Therapeutic Target for Age-Related Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, v. 3, n. 82, p. 1-9, doi:10.3389/fphar.2012.00082, 2012.

ONO, K.; YAMADA, M. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro. *Journal of Neurochemistry*, v. 97, n. 1, p. 105-115, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03707.x, 2006.

OUESLATI, A. et al. Mimicking phosphorylation at serine 87 inhibits the aggregation of human  $\alpha$ -synuclein and protects against its toxicity in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 5, p. 1536-1544, doi:10.1523/JNEUROSCI.3784-11.2012, 2012.

OUTEIRO, T. F. et al. Sirtuin 2 Inhibitors Rescue a-Synuclein-Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease. *Science*, v. 317, n. 5837, p. 516-519, 2007.

OUTEIRO, T. F. et al. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PloS One*, v. 3, n. 4, p. 1867-1877, doi:10.1371/journal.pone.0001867, 2008.

OUTEIRO, T. F. et al. Dopamine-induced conformational changes in alpha-synuclein. *PloS One*, v. 4, n. 9, p. 690-696, doi:10.1371/journal.pone.0006906, 2009.

OUTEIRO, T. F.; LINDQUIST, S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*, v. 302, n. 5651, p. 1772-1775, doi:10.1126/science.1090439, 2003.

OUTEIRO, T. F.; MARQUES, O.; KAZANTSEV, A. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1782, n. 6, p. 363-392, doi:10.1016/j.bbadis.2008.02.010, 2008.

PABÓN, M. M. *An Observation of Immunological Effect, a Diet Enhanced With Spirulina and Treatment With Fractalkine in Models of Parkinson's Disease*. 2011.

PACHECO, C.; AGUAYO, L. G.; OPAZO, C. An extracellular mechanism that can explain the neurotoxic effects of  $\alpha$ -synuclein aggregates in the brain. *Frontiers in Physiology*, v. 3, n. 297, p. 3-10, doi:10.3389/fphys.2012.00297, 2012.

PAIS, T. F. et al. The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglia activation and brain inflammation. *The EMBO Journal*, v. 32, n. 19, p. 2540-2559, 2013.

PERFEITO, R.; REGO, A. C. Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. *Revista Neurociência*, 2011. [in press]. Disponível em: <<http://www.revistaneurociencias.com.br/inpress/619%20revisao%20inpress.pdf>> Acesso em: 20 set. 2013.

POLJSAK, B. et al. Reproductive benefit of oxidative damage: an oxidative stress “malevolence”? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2011, n. 1, p. 1-9, doi:10.1155/2011/760978, 2011.

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson’s disease. *Science*, v. 276, n. 5321, p. 2045–2047, 1997.

POSTMA, L.; LEHRACH, H.; RALSER, M. Surviving in the cold: yeast mutants with extended hibernating lifespan are oxidant sensitive. *Aging*, v. 1, n. 11, p. 957-960, 2009.

RALSER, M.; MICHEL, S.; BREITENBACH, M. Sirtuins as regulators of the yeast metabolic network. *Frontiers in Pharmacology*, v. 3, n. 32, p. 1-15, doi:10.3389/fphar.2012.00032, 2012.

RISTOW, M.; SCHMEISSER, S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 51, n. 2, p. 327-336, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010, 2011.

RITZ, B. et al.  $\alpha$ -Synuclein genetic variants predict faster motor symptom progression in idiopathic Parkinson disease. *PloS One*, v. 7, n. 5, p. 361-399, doi:10.1371/journal.pone.0036199, 2012.

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.

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

SAMPAIO-MARQUES, B. et al. SNCA (  $\alpha$ -synuclein ) -induced toxicity in yeast cells is dependent on sirtuin 2 ( Sir2 ) -mediated mitophagy. *Autophagy*, v. 8, n. 10, p. 1494-1509, 2012.

SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death and Differentiation*, v. 14, n. 7, p. 1261-1266, doi:10.1038/sj.cdd.4402160, 2007.

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.

SEBASTIÁN, C. et al. From sirtuin biology to human diseases: an update. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 51, p. 44-52, doi:10.1074/jbc.R112.402768, 2012.

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.

SILVA, B. A. et al. Agrochemicals,  $\alpha$ -synuclein, and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 598-612, doi:10.1007/s12035-012-8333-2, 2012.

SINCLAIR, D. A.; GUARENTE, L. Extrachromosomal rDNA circles – a cause of aging in yeast. *Aging Cell*, v. 91, n. 1, p. 1033–1042, 1997.

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, p. 45-47, 2005.

SOPER, J. H. et al. Aggregation of  $\alpha$ -synuclein in *S. cerevisiae* is associated with defects in endosomal trafficking and phospholipid biosynthesis. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 43, n. 3, p. 391-405, doi:10.1007/s12031-010-9455-5, 2011.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 63, n. 4, p. 381-389, 1988.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. K.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, v. 140, n. 3, p. 569-576, 1994.

SU, L. J. et al. Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease models. *Disease Model & Mechanisms*, v. 3, n. 1, p. 194-208, 2010.

SZWARCWALD, C. L. et al. Health inequalities in Rio de Janeiro, Brazil: lower healthy life expectancy in socioeconomically disadvantaged areas. *American Journal of Public Health*, v. 101, n. 3, p. 517-523, doi:10.2105/AJPH.2010.195453, 2011.

TAKEDA, K. et al. Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 8, p. 3540-3545, doi:10.1073/pnas.0911055107, 2010.

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

TENREIRO, S. et al. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, v. 127, n. 4, p. 438-452, doi:10.1111/jnc.12271, 2013.

TENREIRO, S.; OUTEIRO, T. F. Simple is good: yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Research*, v. 10, n. 8, p. 970-979, doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00649.x, 2010.

TERAOKA, M. et al. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against  $\alpha$ -synuclein-related toxicity in catecholaminergic PC12 cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 51, n. 2, p. 122-127, doi:10.3164/jcbn.D-11-00030, 2012.

TOFARIS, G. K. et al. Ubiquitin ligase Nedd4 promotes  $\alpha$ -synuclein degradation by the endosomal – lysosomal pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 41, p. 17004-17009, doi:10.1073/pnas.1109356108/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1109356108, 2011.

TOFARIS, G. K. Lysosome-dependent pathways as a unifying theme in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 27, n. 11, p. 1364-1369, doi:10.1002/mds.25136, 2012.

TRACHOOTHAM, D. et al. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, doi:10.1089/ars.2007.1957, 2008.

TREDICI, K. Del.; BRAAK, H. Spinal cord lesions in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, v. 124, n. 5, p. 643-664, doi:10.1007/s00401-012-1028-y, 2012.

ULUSOY, A.; MONTE, D. Di. A-Synuclein Elevation in Human Neurodegenerative Diseases: Experimental, Pathogenetic, and Therapeutic Implications. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 484-494, doi:10.1007/s12035-012-8329-y, 2012.

VANDEPUTTE, C. et al. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biology and Toxicology*, v. 10, p. 415-421, 1994.

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.

VENDEROVA, K.; PARK, D. S. Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 8, p. 93-65, doi:10.1101/cshperspect.a009365, 2012.

VIVES-BAUZA, C.; PRZEDBORSKI, S. Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*, v. 17, n. 3, p. 158-165, doi:10.1016/j.molmed.2010.11.002, 2011.

WALES, P. et al. Limelight on Alpha-Synuclein: Pathological and Mechanistic Implications in Neurodegeneration. *Journal of Parkinson's Disease*, v. 3, n. 4, p. 415-459, doi:10.3233/JPD-130216, 2013.

WAN, O. W.; CHUNG, K. K. K. The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *Plos One*, v. 7, n. 6, p. 38545-38559, doi:10.1371/journal.pone.0038545, 2012.

WEBSTER, B. R. et al. The role of sirtuins in modulating redox stressors. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 52, n. 2, p. 281-290, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.484, 2012.

WILLINGHAM, S. et al. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science*, v. 302, n. 5651, p. 1769–1772, 2003.

WITT, S. N. Molecular chaperones, alpha-synuclein, and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 552-560, doi:10.1007/s12035-012-8325-2, 2012.

XILOURI, M.; BREKK, O. R.; STEFANIS, L. Alpha-synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 537-551, doi:10.1007/s12035-012-8341-2, 2012.

XIONG, Y., et al. GTPase activity plays a key role in the pathobiology of LRRK2. *Plos Genetics*, v. 6, n. 1, p. 1-18, 2010.

XUAN, Q. et al. Increase expression of  $\alpha$ -synuclein in aged human brain associated with neuromelanin accumulation. *Journal of Neural Transmission*, v. 118, n. 11, p. 1575-1583, doi:10.1007/s00702-011-0636-3, 2011.

YASUDA, T.; NAKATA, Y.; MOCHIZUKI, H. A-Synuclein and Neuronal Cell Death. *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 466-483, doi:10.1007/s12035-012-8327-0, 2012.

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.

YU, B. P.; CHUNG, H. Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 127, n. 5, p. 436-443, doi:10.1016/j.mad.2006.01.023, 2006.

ZHOU, H. N. et al. Evaluation of arthrospira (Spirulina) platensis production trait using cpchid operon. *Pakistan Journal of Botany*, v. 45, n. 2, p. 687-694, 2013.



