

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Aumento da resistência ao estresse oxidativo induzido
pelo Extrato Hidroalcoólico de Carqueja (*Baccharis trimera*)
no *Caenorhabditis elegans*: seria através de um mecanismo
SKN-1/p38 MAPK e DAF-16 dependente?**

Franciny Aparecida Paiva

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Aumento da resistência ao estresse oxidativo induzido
pelo Extrato Hidroalcoólico de Carqueja (*Baccharis trimera*)
no *Caenorhabditis elegans*: seria através de um mecanismo
SKN-1/p38 MAPK e DAF-16 dependente?**

Franciny Aparecida Paiva

Orientadora

Riva de Paula Oliveira

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Ouro
Preto como requisito parcial para obtenção
do Título de Mestre em Biotecnologia.**

Ouro Preto

2011

P149a

Paiva, Franciny Aparecida.

Aumento da resistência ao estresse oxidativo induzido pelo extrato hidroalcoólico de carqueja (*Baccharis trimera*) no *Caenorhabditis elegans* [manuscrito]; seria através de um mecanismo SKN-1/p38 MAPK e DAF-16 dependente? / Franciny Aparecida Paiva. - 2011.

x, 70f.: il., color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Riva de Paula Oliveira.

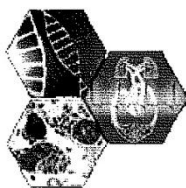
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Processos e ao Tratamento de Doenças.

1. Antioxidantes - Teses. 2. *Baccharis trimera* - Teses. 3. *Caenorhabditis elegans* - Teses. 4. Estresse oxidativo - Teses. 5. Quercetina - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 612.397

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Aumento da resistência ao estresse oxidativo induzido pelo Extrato Hidroalcoólico de Carqueja (*Baccharis trimera*) no *Caenorhabditis elegans*: seria através de um mecanismo SKN-1/p38 MAPK e DAF-16 dependente?”

Ao 1º dia do mês de abril de 2011, às 09h00min, na Sala de Seminários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Franciny Aparecida Paiva. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por approved! a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Profª. Dra. Riva de Paula Oliveira
Presidente

Profª. Dra. Míriam Chaves Schultz
Examinadora (UFMG)

Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 01/04/2011

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me dar forças para seguir em frente.

A todos os meus familiares pelo apoio, incentivo, amor e dedicação.

Gostaria de agradecer à professora Riva de Paula Oliveira pela oportunidade de desenvolver este projeto. Gostaria de parabenizá-la também pelo seu profissionalismo, determinação e força de vontade, por persistir sempre e não desistir dos seus objetivos. Obrigada pelos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Genética: David, Val, Larissa, Ricardo, Paty, Igor, Heverton, Washington por todos os momentos maravilhosos compartilhados.

Aos amigos da pós-graduação, membros da B.P do mestrado/doutorado, minha segunda família. Obrigada pelos momentos inesquecíveis e pela grande amizade que sempre demonstraram.

Aos demais laboratórios e professores da UFOP que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O alto consumo de comidas e bebidas ricas em flavonóides tem sido associado a um menor risco de doenças degenerativas crônicas como aterosclerose e câncer, devido tanto às suas atividades antioxidantes diretas de remoção de radicais livres, quanto à sua capacidade de atuar como antioxidante indireto ativando diferentes vias de sinalização em resposta ao estresse oxidativo. *Baccharis trimera*, conhecida como carqueja, é uma planta subarborescente cujos extratos aquoso e hidroalcoólico são ricos em compostos antioxidantes tais como os ésteres do ácido quínico e os flavonóides nepetina, isoquercetina e quercetina. Recentemente, diversos estudos tem destacado as propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anti-proteolítica e anti-hemorragica tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo*. Neste projeto, nós investigamos o potencial antioxidante e pró-longevidade do extrato hidroalcoólico de carqueja (EHC) no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Para testar se o tratamento com o extrato hidroalcoólico de carqueja (EHC) aumenta a resistência ao estresse oxidativo, animais tipo selvagem foram tratados por 48 horas com 0,5, 5 e 50 mg/mL de EHC por 48 horas e depois submetidos ao estresse provocado por hidróperóxido de *t*-butila (*t*-BOOH). O tratamento com 5 mg/ml aumentou significativamente a sobrevivência dos animais submetidos a 5 mM de *t*-BOOH. Embora o tratamento com 5 mg/ml por 48 horas ter aumentado a resistência ao estresse oxidativo, este mesmo tratamento não aumentou a resistência ao estresse térmico a 35°C. O tratamento contínuo com 5 mg/ml de extrato de carqueja também não aumentou a longevidade dos animais tipo selvagem em condições normais. Apesar de apresentarem uma maior resistência ao estresse, os animais tratados com 5mg/ml do extrato de carqueja por 48 horas não apresentaram uma diferença significativa quanto aos marcadores bioquímicos (atividade da catalase) e indicadores de resistência (níveis de proteína carbonilada e sulfidrila totais) analisados em relação aos animais do grupo controle. Para averiguar se o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com extrato de carqueja depende da ativação dos fatores de transcrição SKN-1 e DAF-16, os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando mutantes de deleção ou “knockdown” para estes dois fatores. O tratamento com carqueja não aumentou a resistência ao estresse oxidativo dos mutantes *skn-1(RNAi)*, *sek-1* e *daf-16*. Por outro lado, também não foi observada a indução da localização nuclear nos animais tratados contendo gene repórter *SKN-1::GFP* e *DAF-16::GFP*. O presente trabalho sugere que EHC aumenta a resistência ao estresse oxidativo de uma maneira SKN/p38 MAPK e DAF-16 dependente. Porém, as análises de genes repórteres realizadas até o momento não corroboraram com estas observações.

ABSTRACT

High consumption of foods and beverages rich in flavonoids have been associated with reduced risk of chronic degenerative diseases such as atherosclerosis and cancer due to both their direct antioxidant activities by neutralizing free radicals, and indirect antioxidant activity by activating different pathways signaling against oxidative stress. *Baccharis trimera*, known as carqueja, undergrowth is a plant whose aqueous and hydroalcoholic are rich in antioxidant compounds such as esters of quinic acid and flavonoids nepetin, isoquercetina and quercetin. Recently, several studies have highlighted the carqueja antioxidant, anti-inflammatory, anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties both *in vitro* and *in vivo*. In this project, we investigated the antioxidant potential and pro-longevity of the hydroalcoholic extract of carqueja in the model organism *Caenorhabditis elegans*. To test whether treatment EHC increases resistance to oxidative stress, wild-type animals were treated for 48 hours with 0.5, 5 and 50 mg / mL of EHC for 48 hours and then subjected the stress caused by tert-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH). Treatment with 5 mg / ml significantly increased the survival of animals submitted to 5 mM *t*-BOOH. Despite the 5 mg/mL of EHC treatment for 48 hours have increased resistance to oxidative stress, this same treatment did not increase the resistance to heat stress at 35°C. Continuous treatment with 5 mg/mL of EHC did not increase the longevity of wild-type animals under normal conditions. Although providing a higher resistance to stress, the animals treated with 5 mg/mL of EHC for 48 hours did not show a significant difference regarding biochemical markers (catalase activity) and indicators of resistance (total sulfhydryl and protein carbonyl levels) analyzed compared to control animals. In order to investigate whether the increased oxidative stress resistance induced by EHC treatment depends on the activation of transcription factors SKN-1 and DAF-16, the oxidative stress resistance assays were repeated using mutants or "knockdown" for these two factors. Treatment with EHC did not increase oxidative stress resistance in the mutants *skn-1(RNAi)*, *sek-1* and *daf-16*. However, treatment with EHC did not SKN-1:: GFP and DAF-16:: GFP nuclear localization. In conclusion, EHC treatment increases oxidative stress resistance in a way SKN-1/p38 MAPK and DAF-16 dependent. But the analysis of reporters genes performed to date does not corroborate these observations.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	2
1.2 MECANISMOS ENZIMÁTICOS E NÃO-ENZIMÁTICOS DE COMBATE AO ERO.....	3
1.3 CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM MAMÍFEROS.....	4
1.3.1 Proteínas Nrf2 (Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2).....	5
1.3.2 Proteínas FoxO (Forkhead Box).....	6
1.4 PLANTAS MEDICINAIS E FITOQUÍMICOS COMO MECANISMO DE COMBATE AO ERO.....	6
1.5 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA CARQUEJA (<i>BACCHARIS TRIMERA</i>).....	9
1.6 O NEMATODO <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	11
1.7 CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO <i>C. ELEGANS</i>	12
1.7.1 A via de sinalização SKN-1/Nrf2.....	13
1.7.2 A via de sinalização de DAF-2/Ins/IGF-1.....	16
1.7.3 <i>C. elegans</i> como um modelo para estudos de fitoquímicos.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. METODOLOGIA.....	21
3.1 CEPAS E LINHAGENS.....	22
3.2 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DO <i>C. ELEGANS</i>	22
3.3 SINCRONIZAÇÃO CRONOLÓGICA DO <i>C. ELEGANS</i>	23
3.4 EXTRATO DE CARQUEJA.....	23
3.4.1 Coleta do material botânico.....	23

3.4.2	Preparo do extrato hidroalcoólico de carqueja (EHC).....	24
3.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	24
3.5.1	Preparação das placas NGM contendo EHC.....	24
3.5.2	Ensaio de Resistência ao Estresse Oxidativo.....	24
3.5.3	Ensaio de Resistência ao Estresse Térmico.....	25
3.5.4	Ensaio de Longevidade.....	25
3.6	DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	26
3.6.1	Dosagem dos níveis totais de grupos de sulfidrilas.....	26
3.6.2	Dosagem da atividade da catalase.....	26
3.6.3	Dosagem dos níveis de proteína carbonilada.....	27
3.6.4	Dosagem de proteínas totais.....	28
3.7	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE SKN-1 E DAF-16.....	29
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4.	RESULTADOS.....	31
4.1	ANÁLISE DO EFEITO DOSE-RESPOSTA DO TRATAMENTO COM EHC NA SOBREVIVÊNCIA DO <i>C. ELEGANS</i> EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	32
4.2	ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DO <i>C. ELEGANS</i> TRATADO COM EHC SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO.....	34
4.3	ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DO <i>C. ELEGANS</i> TRATADO COM EHC SOB CONDIÇÕES NORMAIS.....	34
4.4	ANÁLISE DE MARCADORES BIOQUÍMICOS E ENZIMÁTICOS NO <i>C. ELEGANS</i> TRATADO COM EHC.....	38
4.5	ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE SKN-1/p38 MAPK NO AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO PELO EHC.....	38
4.5.1	Análise da sobrevivência de mutantes <i>skn-1</i> e <i>sek-1</i> tratados com EHC sob condições de estresse oxidativo.....	41
4.5.2	Análise da localização subcelular de SKN-1.....	42
4.6	ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO VIA DE SINALIZAÇÃO DAF-16 NO AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO PELO EHC ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE DAF-16.....	46
4.6.1	Análise da sobrevivência de mutante <i>daf-16</i> tratado com EHC sob condições de estresse oxidativo.....	46
4.6.2	Análise da localização subcelular de DAF-16.....	46
5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	50
5.1	PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA <i>B. TRIMERA</i> NO <i>C. ELEGANS</i>	51
5.1.1	Ensaio Biológicos.....	52
5.1.2	Dosagens Bioquímicas.....	55

5.2 MECANISMOS DE AÇÃO DO ECH.....	56
5.2.1 A via de sinalização SKN-1/p38 MAPK.....	57
5.2.2 A via de sinalização de DAF-16.....	58
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise da longevidade dos animais tipo selvagem tratados com EHC

Tabela 2. Efeito do tratamento com 5 mg/mL de EHC sobre a atividade de catalase e os níveis dos grupos sulfidrilas totais e proteína carbonilada

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida do *C. Elegans*
- Figura 2.** Expressão de *SKN-1B/C::GFP* em animais em animais tipo selvagem
- Figura 3.** Regulação de Nrf2 e FOXO em condições de estresse
- Figura 4.** Esquema dos genes repórter para SKN-1 (A) e DAF-16 (B)
- Figura 5.** Efeito dose-resposta do tratamento com EHC na sobrevivência do *C. elegans* em condições de estresse oxidativo
- Figura 6.** Sobrevivência do *C. elegans* tratado com EHC sob condições de estresse térmico
- Figura 7.** Sobrevivência do *C. elegans* tratado com carqueja sob condições normais.
- Figura 8.** Dosagem dos marcadores bioquímicos e enzimático no *C. elegans* tratado com carqueja
- Figura 9.** Sobrevivência de mutantes para SKN-1 e SEK-1 tratados com carqueja sob condições de estresse oxidativo
- Figura 10.** Localização subcelular de *SKN-1B/C::GFP* em animais tipo selvagem tratados com carqueja
- Figura 11.** Sobrevivência do mutante para DAF-16 tratado com carqueja sob condições de estresse oxidativo
- Figura 12.** Localização subcelular de *DAF-16::GFP* em animais tipo selvagem tratados com EHC

ABREVIATURAS

ARE - Elemento de Resposta Antioxidante

CAT - Catalase

CYPs - Citocromo P450

EHC – Extrato Hidroalcoólico de Carqueja

EpRE - Elemento de Resposta à Eletrófilo

ERK - Proteína Quinase Regulada por Sinal Extracelular

Eros – Espécies Reativas de Oxigênio

FOXO - Forkhead Box

GCS - γ -glutamilcisteína Sintetase

GPx - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

GSK3 β - Glicogênio Sintase Quinase-3 β

GST - Glutathione S-transferase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

JNK - c-Jun N-terminal kinase

MAPK - Proteínas Ativadas por Mitógenos

Nrf2 - Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2

PKC - Proteína Quinase C

SDRs - Desidrogenases/Redutases de Cadeia Curta

SOD - Superóxido Dismutase

t-BOOH - *tert*-butil Hidroperóxido

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é o principal fator para a etiologia de várias doenças e patologias relacionadas ao envelhecimento (WALLACE & MELOV, 1998) e ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema de defesa antioxidante em favor do lado pró-oxidativo. O excesso de EROs danificam importantes macromoléculas celulares como lipídios, proteínas e DNA (FINDEL & HOLBROOK, 2000) e leva à perda da integridade e funcionalidade celular. Mutações no DNA genômico e aberrações cromossômicas causadas por estresse oxidativo são consideradas um fator essencial para a iniciação de tumores (KOVACIC & JACINTHO, 2001; VALKO *et al.*, 2006). Nas doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson o estresse oxidativo é assumido estar envolvido na criação de agregados protéicos patológicos (FORSBERG *et al.*, 2001). O excesso de EROs também aumenta a inflamação associada com arterosclerose e artrite reumatóide (GRIFFITHS, 2005; SCHROECKSNADEL *et al.*, 2006). Estresse oxidativo é também, no mínimo parcialmente, responsável pelo processo de envelhecimento. Embora o excesso de ERO possa ser considerado tóxico, é necessário como um mensageiro intracelular para a manutenção da homeostase redox celular, para o controle da proliferação celular e a regulação de vias de sinalizações específicas (CHOI *et al.*, 1998; FINDEL & HOLBROOK, 2000). Este reconhecido caráter “dupla face” dos EROs tem contribuído para o estabelecimento de uma redefinição de estresse oxidativo clássico “desequilíbrio de pró-oxidantes e antioxidantes” para um conceito mais contemporâneo sobre uma “ruptura do controle e sinalização redox” (JONES, 2006).

Os EROs podem ser gerados de forma endógena durante o metabolismo celular, ou de forma exógena, como por exposição à drogas e compostos estressores (COOKE *et al.*, 2003). Aproximadamente 1 a 3% do oxigênio consumido pelo corpo é convertido em ERO (SOHAL & WEINDRUCH, 1996). Três dos maiores EROs – radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila – são subprodutos metabólicos normais que são formados continuamente pela mitocôndria de células em crescimento (McCORD, 2000; CASTRO & FREEMAN, 2001; LOPACZYNSKI & ZEISEL, 2004). Outras fontes intracelulares significantes de ERO incluem as enzimas do citocromo P450 microsomal, flavoproteínas oxidases e enzimas peroxissomais envolvidas no metabolismo de ácidos graxos (CASTRO & FREEMAN, 2001).

1.2 MECANISMOS ENZIMÁTICOS E NÃO-ENZIMÁTICOS DE COMBATE ÀS EROs

Essencialmente todos os organismos vivos possuem uma variedade de moléculas e mecanismos que previnem ou reduzem os danos causados por EROs. A homeostase do oxigênio – equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes – é mantida através de reduções naturais – reações de oxi-redução (redox) envolvendo a transferência de elétrons entre duas espécies químicas: compostos que perdem elétrons (oxidadas) e aqueles que ganham elétrons (reduzidas) (SOHAL & WEINDRUCH, 1996).

Antioxidantes são substâncias que atacam e neutralizam os EROs prevenindo os danos causados por eles. Antioxidantes podem ser classificados em dois grupos principais: enzimáticos e não-enzimáticos (RATNAM *et al.*, 2006).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos, a grande maioria deles, com exceção dos antioxidantes de baixo peso molecular, são obtidos de fontes dietéticas. Antioxidantes da dieta são classificados em várias classes, das quais os polifenóis são a maior. As outras classes incluem vitaminas, carotenóides, compostos organosulfurados, minerais e cofatores que desempenham um papel importante na manutenção da saúde humana (RATNAM *et al.*, 2006).

Os antioxidantes enzimáticos são produzidos endogenamente e fazem parte de um complexo sistema de detoxificação de três fases, altamente conservado entre eucariotos (XU; LI; KONG, 2005; SARKADI *et al.*, 2006). Durante a fase 1, endobióticos lipofílicos ou xenobióticos são solubilizados através da modificação por enzimas, tais como a citocromo P450 (CYPs) e desidrogenases/reduções de cadeia curta (SDRs). Estas enzimas usam NAD ou NADP como cofator para adicionar um grupo reativo, como hidroxila. Este processo permite que compostos tóxicos sejam excretados, mas pode também produzir compostos reativos nocivos (SARKADI *et al.*, 2006). Se estas moléculas reativas não forem metabolizadas pelas enzimas de fase 2, elas podem causar danos a proteínas, RNA e DNA (VERMEULEN *et al.*, 1996).

As enzimas de fase 2 além de defenderem as células contra compostos gerados na fase 1 também agem sobre os EROs produzidos endogenamente. Elas englobam um grupo diverso constituído de enzimas que metabolizam radicais livres, reparam estruturas celulares ou conjugam diretamente xenobióticos e lipídios peroxidados

(SARKADI *et al.*, 2006). Os antioxidantes enzimáticos de fase 2 de detoxificação incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), γ -glutamylcisteína sintetase (GCS), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) (CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU & MUZYKANTOV, 2006). SOD e CAT estão entre os mais potentes antioxidantes conhecidos na natureza (RATNAM *et al.*, 2006). SOD catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e isto é difundido na natureza em organismos eucarióticos e procarióticos. CAT protege as células catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água sem produção de radicais livres (McCORD, 1986; SIES, 1993; RATNAM *et al.*, 2006). A GCS é uma enzima chave para a síntese de glutathione, um tripeptídeo (g-L-glutamyl-L-cisteinil-glicina), que existe nos organismos nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas e proteção celular (GIPP; BAILEY; MULCAHY, 1995; HAMILTON, 2003; MA, 2010). As GSTs catalizam a conjugação de GSH ao centro eletrofílico de uma variedade de substratos. A glutathione peroxidase catalisa a reação da glutathione reduzida (GSH) com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Outra enzima que age conjuntamente com a glutathione peroxidase é a enzima glutathione reductase (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de radicais livres, porém é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (LU, 2000; ARGYROU & BLANCHARD, 2004; ROGERS *et al.* 2004; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

Finalmente, na fase 3 de detoxificação, os conjugados tóxicos são bombeados para fora da célula por transportadores cassetes de ligação de ATP (Transportador ABC) ou outros transportadores (SARKADI *et al.*, 2006).

1.3 CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM MAMÍFEROS

A condição de estresse oxidativo na célula induz várias respostas fisiológicas e patológicas. Estas respostas, em última análise, causam mudanças no perfil transcricional de forma a influenciar o destino da célula e a progressão de uma doença.

Nas últimas décadas, muitos fatores de transcrição e vias de sinalização foram identificados pelo seu papel crítico na resposta ao estresse oxidativo (MA, 2010). Dentre estes fatores, podemos citar as proteínas Nrf e FOXO.

1.3.1 Proteínas Nrf2 (Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2)

Em vertebrados, a maior defesa contra o estresse oxidativo é orquestrada pelos fatores de transcrição Nrf1/2 (HAYES & McMAHON, 2001; MOTOHASHI & YAMAMOTO, 2004; XU *et al.*, 2005). Nrf2 (Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2), um membro dos fatores de transcrição zíper de leucina, é essencial para a indução coordenada de genes que codificam enzimas de resposta ao estresse ou citoprotetivas e proteínas relacionadas, tais como o NAD(P) H: quinona oxidoredutase-1 (NQO1), superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx), heme oxigenase-1 (HO-1), glutamato cisteína (GCL), catalase e tioredoxina (AN & BLACKWELL, 2003).

Nas células em repouso, Nrf2 localiza-se no citoplasma, formando um complexo inativo com o repressor KEAP-1, que está ancorado à actina do citoesqueleto. Sob estresse oxidativo ou eletrofílico, Nrf2 é fosforilado e se transloca para o núcleo. Após a migração para o núcleo, Nrf2 sofre uma combinação heterodimérica com outros fatores de transcrição, como as pequenas proteínas MAFs e se liga à sequência de ativação reguladora 5', denominada elemento de resposta antioxidante (ARE) ou elemento de resposta à eletrófilo (EpRE), localizado na região promotora de genes que codificam enzimas antioxidantes/detoxicantes (ZHANG, 2006; SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008; SURH; KUNDU; NA, 2008; TULLET *et al.*, 2008).

Já foi descrito que Nrf2 pode ser ativado por diferentes vias de sinalização. As vias das proteínas ativadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/Akt), proteína quinase C (PKC) e caseína quinase-2 (CK-2) têm sido consideradas facilitar a translocação nuclear e ativação transcricional de genes alvos de Nrf2. Por outro lado, a glicogênio sintase quinase-3 β (GSK3 β) regula negativamente a sinalização Nrf2 através da fosforilação dos resíduos de tirosina ou serina (SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008).

1.3.2 Proteínas FOXO (Forkhead Box)

Outro fator de transcrição conhecido por seu papel nas respostas celulares aos estresses ambiental e fisiológico pertence à família das proteínas FOXO. Um único gene FOXO está presente em *Drosophila* (dFOXO) e *C. elegans* (*daf-16*) e quatro estão presentes em camundongos e humanos (FOXO1, FOXO3, FOXO4, e FOXO6) (LANDIS & MURPHY, 2010; YEN; NARASIMHAN; TISSENBAUM, 2011). Em *Drosophila*, *C. elegans* e células de mamíferos, as proteínas FOXO aumentam a resistência ao estresse oxidativo e a expressão dos seus genes alvos sob condições de pouco nutrientes e durante o choque térmico no *C. elegans*. A atividade das proteínas FOXO é regulada por modificação pós-transcricional, incluindo a fosforilação. Em resposta à via da insulina/IGF-1 e outros fatores de crescimento, Akt e SGK, as proteínas FoxO são fosforiladas (com exceção dos FOXO6) em três sítios conservados. Esta fosforilação promove a ligação de FOXO às proteínas 14-3-3 e sua localização no citoplasma onde as proteínas FOXO não podem regular a transcrição. Em contrapartida, em resposta ao estresse, a via JNK (c-Jun N-terminal kinase) fosforila diretamente FOXO ativando a sua localização nuclear (MA, 2010; YEN; NARASIMHAN; TISSENBAUM, 2011). O aumento da atividade transcricional de FOXO aumenta a expressão gênica de *cat* e *sod2* e, portanto, aumenta a detoxificação de EROs (MA, 2010).

1.4 PLANTAS MEDICINAIS E FITOQUÍMICOS COMO MECANISMO DE COMBATE AO ERO

Na história da medicina, as plantas medicinais sempre foram utilizadas como instrumento de cura para o tratamento de diversas enfermidades. A partir de plantas descritas e usadas pelo conhecimento popular, foram descobertos diversos medicamentos usados, até hoje, na medicina. Os salicilatos, por exemplo, foram descobertos através de estudos no Salgueiro Branco (*Salix alba*), que era usado pelos índios norte-americanos no tratamento de dor e febre. O resgate da sabedoria popular do uso terapêutico de plantas oferece um suporte científico para o desenvolvimento de novos medicamentos (GOMES & GOMES, 2000).

Nas últimas décadas, tem se observado um crescimento do uso de plantas medicinais no mercado mundial. As principais razões que impulsionaram este grande crescimento foram: a valorização de uma vida de hábitos mais saudáveis e,

consequentemente, o consumo de produtos naturais; os evidentes efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos; a descoberta de novos princípios ativos nas plantas; a comprovação científica dos benefícios dos fitoterápicos; e o preço que, de maneira geral, é mais acessível à população com menor poder aquisitivo.

O Brasil é o país com a maior biodiversidade genética vegetal do planeta, contando com mais de 120.000 espécies catalogadas, distribuídas em diferentes biomas, das quais somente cerca de 10% foram estudadas segundo os aspectos químicos e farmacológicos (KOROLKOVAS, 1988). Isto faz com que a flora brasileira seja alvo de grande interesse pelas indústrias farmacêuticas, na tentativa de descoberta de novos medicamentos para o arsenal terapêutico.

Muitos compostos em plantas e vegetais têm a habilidade de reagir com radicais livres sem criar mais radicais, portanto, extinguindo a reação em cadeia. Os compostos antioxidantes reagem diretamente com os radicais reduzindo o estresse oxidativo e os danos celulares. Os polifenóis constituem a maior classe de antioxidantes da dieta. Os polifenóis compreendem uma variedade de compostos, divididos em várias classes (antocianinas, proantocianinas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas, flavonóides, etc), que ocorrem em frutas e vegetais, vinho, chá, chocolate e outros produtos do cacau (MANACH *et al.*, 2004).

Os flavonóides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular e possuem em sua estrutura química anéis aromáticos, tendo como base o 2-fenil-benzopirano (C6-C3-C6) (AHERNE & O'BRIEN, 2002). Os flavonóides são encontrados em diversos alimentos de origem vegetal, como maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, açaí, cacau, chá e vinho tinto sendo, portanto, constituintes da dieta humana (YOUDIM & JOSEPH, 2001).

Muitos dos efeitos fisiológicos dos flavonóides têm sido atribuídos à sua capacidade antioxidante direta. Antioxidantes diretos, tais como glutathione, tocoferol, ácido ascórbico e carotenóides, são substâncias que podem participar diretamente em processos fisiológicos, bioquímicos e celulares, neutralizando o radical livre ou prevenindo as reações químicas deflagradas pelos radicais livres (SHARONI *et al.*, 2004; MASELLA *et al.*, 2005). Além destas características, antioxidantes diretos compartilham outras características: eles são consumidos ou quimicamente modificados no processo de ação como antioxidantes e devem ser repostos ou regenerados após sua

ação. O efeito antioxidante direto dos flavonóides se deve à capacidade destes compostos em neutralizar os radicais livres (ânion superóxido, radicais hidroxilas e peroxilas) ou quelar íons metálicos (cobre e ferro). Os flavonóides apresentam grupos hidroxilas em sua estrutura, portanto eles podem inibir as reações de oxidação das espécies reativas de oxigênio, por doarem átomos de hidrogênio às espécies, estabilizando-as e transformando-se em quinonas (substâncias pardas). Ao quelar íons metálicos ocorre a inibição da Reação de Fenton, uma forma endógena de produzir espécies reativas (ENIO, 2003). Em adição a estes efeitos sob as espécies reativas, evidências mostram que os flavonóides regulam a atividade de enzimas antioxidantes, modulam receptores nucleares, atuam sobre a expressão gênica e vias de sinalização celular (MOSKAUG, 2004).

Mais recentemente, tem sido descrito que os flavonóides também podem atuar como antioxidantes indiretos (HU *et al.*, 2006; JUGE; MITHEN; TRAKA, 2007). Os antioxidantes indiretos, ao contrário dos diretos, não são capazes de participar diretamente em nenhuma reação redox. O modo de atuação destes compostos é a ativação transcricional dos genes das enzimas detoxificantes da fase 2. Portanto, eles agem cataliticamente, não são consumidos durante sua ação antioxidante e possuem uma meia vida longa que, conseqüentemente, aumentam a capacidade antioxidante da célula (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2002). Várias classes de indutores da fase 2 já foram descritas tais como difenóis, isotiocianatos, metais pesados e peróxido de hidrogênio, entre outros. A indução de enzimas da fase 2 geralmente aumenta a atividade da γ -glutamyl-cisteína sintetase, a enzima limitante da síntese da glutathione, o que conseqüentemente aumenta os níveis da glutathione reduzida (GSH) nos tecidos (MULCAHY *et al.*, 1997). Já foi demonstrado que vários compostos fitoquímicos também são potentes indutores de Nrf2 e das enzimas de detoxificação da fase 2 aumentando a capacidade antioxidante da célula (OSBURN & KENSLER, 2008). Esta ativação aumenta a proteção contra processos inflamatórios, estresse oxidativo e desenvolvimento de tumores (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2005). Evidências *in vivo* mostraram que camundongos deficientes para Nrf2 não respondem à proteção dos antioxidantes e são mais susceptíveis a carcinogênese (FAHEY *et al.*, 2002; RAMOS-GOMES *et al.*, 2001).

Sabe-se que fitoquímicos da dieta, incluindo os polifenóis, também podem atuar de outras formas. Os fitoquímicos podem agir diretamente no complexo Nrf2-Keap 1 ou

alternativamente nas quinases acima em diferentes vias de sinalização tais como p38, proteína quinase C (PKC), proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase c-jun Nterminal (JNK), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), causando a liberação de Nrf2 do complexo inibitório (SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008). Adicionalmente, certos fitoquímicos podem inibir a degradação proteolítica de Nrf2 pelo proteassoma e prolongar seu tempo de vida médio. Nrf2 ativado transloca para o núcleo onde interage com pequenas proteínas da família MAF ligadas, liga-se à região ARE, permitindo a transcrição de genes alvos incluindo antioxidantes e enzimas de fase 2 (BENSASSON *et al.*, 2008). FOXO também pode ser ativado por fitoquímicos, como, por exemplo, o resveratrol e a quercetina, resultando em ativação de genes envolvidos no metabolismo energético e em vias antioxidante (KAMPKÖTER *et al.*, 2007).

1.5 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA CARQUEJA (*BACCHARIS TRIMERA*)

Uma planta muito utilizada na medicina popular é a *Baccharis trimera*, popularmente conhecida como carqueja. É uma planta subarborescente, dióica, aromática com altura variável entre 1,0 e 1,6 m (CASTRO & FERREIRA, 2000). É uma espécie de elevada rusticidade que cresce bem em plenas condições de sol, sendo típica de lugares abertos ou de campo (OLIVEIRA *et al.*, 1999). É amplamente distribuída na América do Sul. As partes aéreas são utilizadas como hipoglicemiante, antiviral, gastroprotetor, hepatoprotetor (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2005; ABAD *et al.*, 1999; GONZALES *et al.*, 2000; SOICKE & LENG-PESCHLOW, 1987)

Análise fitoquímica do extrato aquoso de carqueja mostrou que este é rico em vários compostos antioxidantes entre eles: os ésteres do ácido quínico (3-*O*-[*E*]-Caffeoylquinic acid; 5-*O*-[*E*]-Caffeoylquinic acid; 4-*O*-[*E*]-Caffeoyl-1-methyl-quinic acid; 4,5-*O*-[*E*]-Dicafeoylquinic acid; 3,4-*O*-[*E*]-Dicafeoylquinic acid; 3,5-*O*-[*E*]-Dicafeoylquinic acid) e os flavonóides nepetina, isoquercetina e quercetina. A quercetina é um dos mais importantes flavonóides da dieta e está presente em alimentos vegetais, como maçãs, brócolis, cebola e muitas ervas comestíveis (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007).

Estudos realizados *in vitro* demonstraram que os extratos aquosos e alcoólicos de carqueja foram ativos contra o radical DPPH·(1,1-difenil-2-picril-hidrazil) (SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005; CZYEWski *et al.*, 2008). O extrato aquoso também apresentou

atividade antioxidante *in vitro* como demonstrado pelo ensaio da xantina oxidase (RODRIGUES *et al.*, 2009). Pádua *et al.* (2010) observaram efeito antioxidante do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* em neutrófilos de ratos Fisher tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Esta propriedade antioxidante pode ser atribuída aos compostos presentes na *B. trimera*. Vários dados já foram publicados mostrando as propriedades antioxidantes utilizando a quercetina e os derivados cafeoil isoladamente. Culturas de células neuronais tratadas com quercetina foram mais resistentes ao H₂O₂ do que células não tratadas (ARREDONDO *et al.*, 2010). Além disso, foi observado que a quercetina ativou a translocação nuclear de Nrf2 no modelo de cultura neuronal (ARREDONDO *et al.*, 2010). Estudos realizados com células de leucemia mielóide aguda de humanos e com *Drosophila* mostraram que a quercetina interage com proteínas nucleares (GUTZEIT *et al.*, 2004; BÖHL *et al.*, 2005). Derivados cafeólicos da planta *Dipsacus asper* também exibiram atividade contra a formação do radical DPPH e inibiram significativamente a oxidação de LDL mediada por Cu²⁺ (HUNG *et al.*, 2006). Além disso, células endoteliais vasculares umbilicais de humanos tratadas com o 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid (MCGA3) purificado do extrato etanólico da folha de bambu, foram mais resistentes ao *tert*-Butil hydroperoxide (*t*-BOOH), apresentaram uma expressão da heme oxigenase-1 aumentada. Ainda pode-se observar que os níveis da proteína Nrf2 no núcleo aumentaram em um estágio precoce do tratamento com MCGA3 (3 horas) em paralelo com a diminuição dos níveis de Nrf2 no citoplasma (KWEON *et al.*, 2006).

Além das propriedades antioxidantes, ensaios biológicos utilizando diferentes tipos de extrato de carqueja também mostraram que estes possuem efeitos biológicos diversos. O extrato aquoso de *B. trimera* mostrou ação antiinflamatória no modelo experimental de pleurisia induzida por carrageena em ratos (PAUL *et al.*, 2009). Rodrigues *et al.* (2009) investigaram o efeito genotóxico/antigenotóxico em camundongos e o potencial mutagênico do extrato aquoso de *B. trimera* usando os ensaios de cometa e micronúcleo. O tratamento com extrato aquoso de carqueja não causou nenhum efeito genotóxico no DNA extraído do sangue e fígado mas protegeu as células contra o dano oxidativo ao DNA induzido por H₂O₂. Entretanto, o extrato aumentou a frequência de micronúcleos na medula óssea de camundongos tratados, indicando uma atividade mutagênica cromossomal (PAUL *et al.*, 2009). A fração

aquosa de *B. trimera* reduziu significativamente a glicemia no modelo experimental de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (OLIVEIRA *et al.*, 2005). *B. trimera* possui propriedades anti-proteolítica e anti-hemorrágica em camundongos injetados com veneno de cobra (JANUÁRIO *et al.*, 2004) e a fração de clorofórmio de carqueja apresentou efeito relaxante da musculatura lisa em ratos (TORRES *et al.*, 2000).

Considerando o conjunto das informações acima, fica clara a importância de se caracterizar melhor as propriedades biológicas do extrato de carqueja. Para isso é interessante estudar estas propriedades em diferentes organismos modelos como leveduras (COLLINSON *et al.*, 2011), *Drosophila* (BÖHL *et al.*, 2005) e *Caenorhabditis. elegans* (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007; ONKEN & DRISCOLL, 2010). No presente trabalho os efeitos antioxidantes do extrato de carqueja foram avaliados no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

1.6 O NEMATODO CAENORHABDITIS ELEGANS

Nas últimas décadas, muitas descobertas importantes com relevância para os mamíferos foram feitas usando um organismo bem caracterizado, o nematóide *Caenorhabditis elegans*. Isso foi possível porque há uma forte conservação entre o *C. elegans* e os mamíferos em princípios celulares e moleculares e 60%-80% dos genes humanos possuem homólogos em *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; KALETTA & HENGARTNER, 2006). Hoje, este organismo modelo é cada vez mais usado nos estudos de substâncias benéficas e tóxicas aos processos biológicos, bem como para identificar novos alvos para intervenções farmacológicas (KALETTA & HENGARTNER, 2006; GAMI & WOLKOW, 2006). Em contraste com os estudos com células livres e cultura de células, o *C. elegans* permite a investigação dentro do contexto de um organismo completo, com diversos órgãos e tecidos (KALETTA & HENGARTNER, 2006). Além disso, o *C. elegans* é de fácil cultivo tanto em meio sólido quanto em líquido e sua pequena dimensão permite a realização de ensaios em placas de poliestireno. Por ser um verme transparente, marcadores fluorescentes, por exemplo, genes repórteres, podem ser observados nos animais vivos. Outra vantagem é que o *C. elegans* possui um ciclo de vida curto – dois dias – e o tempo de vida dos animais tipo selvagem é de aproximadamente três semanas, o que o torna um bom modelo para estudos de longevidade. Na natureza, o *C. elegans* é encontrado

predominantemente como hermafroditas (>99%) que se autofecundam e a população pode ser mantida efetivamente isogênica já que um hermafrodita individual produz uma progênie de aproximadamente 300 clones durante a primeira semana de vida adulta. O hermafrodita grávido expela o ovo e após sua eclosão, passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta. Os hermafroditas adultos se autofecundam, iniciando um novo ciclo de vida (Figura 1).

1.7 CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO *C. ELEGANS*

No *C. elegans*, a resposta ao estresse oxidativo e ativação de enzimas da Fase 2 de detoxificação são controlados, em parte, por duas principais vias de sinalização conservadas em mamíferos: p38/SKN-1/Nrf e DAF-2/Ins/IGF-1.

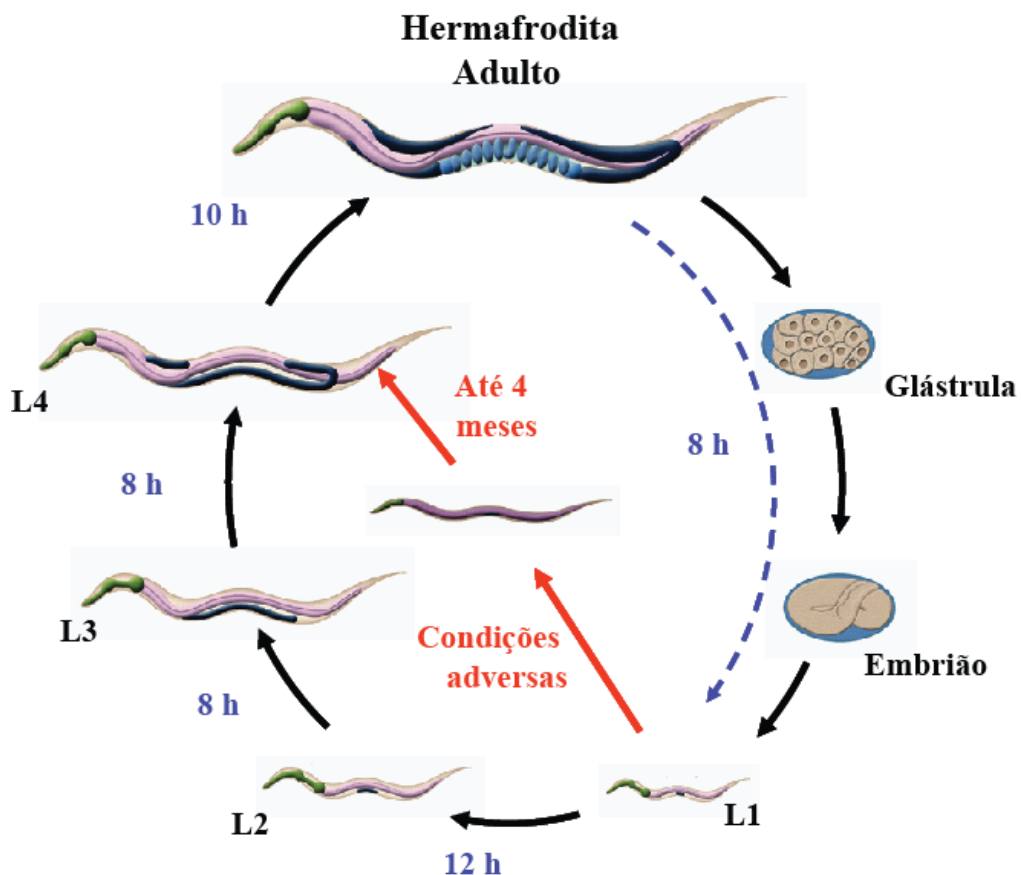


Figura 1. Ciclo de vida do *C. Elegans*

Fonte: worm atlas

1.7.1 A via de sinalização SKN-1/Nrf2

SKN-1 é um fator de transcrição do tipo zíper de leucina (bZIP) que atua de maneira análoga as proteínas Nrf de mamíferos durante estresse oxidativo e xenobiótico ativando os genes antioxidantes da fase 2 (WALKER *et al.*, 2000; AN & BLACKWELL, 2003). Em condições de estresse, SKN-1 acumula no núcleo das células do intestino e ativa a transcrição da enzima γ -glutamylcisteina sintetase (GCS-1) (AN & BLACKWELL, 2003) (Figura 2). SKN-1 integra vários sinais regulatórios, que combinam de forma a inibir ou ativar a expressão dos genes de fase 2 de detoxificação. Na ausência de estresse, SKN-1 é fosforilado pela enzima glicogênio sintetase quinase (GSK-3) prevenindo sua acumulação no núcleo (AN *et al.*, 2005). Já durante o estresse oxidativo induzido por paraquat, azida sódica, arsenito de sódio ou calor, a ativação de SKN-1 requer a sua fosforilação pela PMK-1, uma quinase conservada pertencente à via de sinalização da p38 MAPK (MAPK-Mitogen-Activated Protein Kinase) (Figura 3). SEK-1, a MAPK quinase que fosforila PMK-1 é necessária para ativar a translocação de SKN-1 para o núcleo e ativar a expressão de *gcs-1* (INOUE *et al.*, 2005). Os mutantes com perda de função *skn-1* e *sek-1* são mais sensíveis ao estresse oxidativo e possuem um tempo de vida reduzido em cerca de 25- 30%, o que é consistente com associações descritas entre estresse oxidativo e longevidade (AN & BLACKWELL, 2003; INOUE *et al.*, 2005).

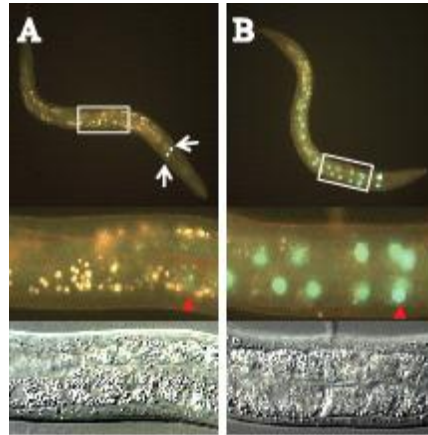


Figura 2. Expressão de *SKN-1B/C::GFP* em *C. elegans* tipo selvagem

As setas brancas indicam os neurônios ASI. Imagens fluorescentes e Contraste de Interferência Diferencial (DIC) de uma larva L2 em close-ups de áreas marcadas por um quadrado branco estão mostradas abaixo. (A) Expressão larval de *SKN-1B/C::GFP* em condições normais. As setas vermelhas apontam para os baixos níveis de expressão de *SKN-1B/C::GFP* nos núcleos das células intestinais. (B) Expressão de *SKN-1B/C::GFP* no intestino durante o estresse oxidativo aumenta significativamente.

Fonte: An & Blackwell (2003).

O perfil transcricional obtido através de análises de microarranjos revelou que SKN-1 em condições de estresse ativa a expressão de vários genes envolvidos em processos de detoxificação e resistência ao estresse, atividade lisossômica e proteossômica de degradação protéica, imunidade inata e várias vias metabólicas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Entre os genes de detoxificação, foram identificadas várias glutatona-S-transferases, UDP-glicosil transferases e genes envolvidos na conjugação de compostos tóxicos, metabolismo de espécies reativas de oxigênio e síntese de glutatona. Além destes genes de fase 2, também foi identificado um número significativo de genes da fase 1 de detoxificação (desidrogenases de cadeia curta e citocromo P450) e da fase 3 (transportadores do tipo ABC e MFS). Outro grupo de genes que também chamou bastante atenção foi os genes envolvidos nas vias lisossômicas e proteossômicas de degradação de proteínas sugerindo que SKN-1

também teria um possível papel na reciclagem de proteínas danificadas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Dentro deste grupo, foram encontrados genes que codificam H⁺ATPases vacuolares que translocam prótons para dentro do lisossomo e outras organelas, serina carboxipeptidases lisossômica e várias subunidades proteassômicas.

Em resposta a estresse provocado por arsenato de sódio (As), foi observada a expressão dependente de SKN-1 de vários genes de detoxificação sendo que, a maioria deles, são também expressos em condições normais. Por outro lado o tratamento com *t*-BOOH ativa a expressão de genes de detoxificação e metabolismo que são na sua maioria SKN-1 independentes. Estas observações sugerem que SKN-1 tem um papel importante tanto em condições normais como durante o estresse (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

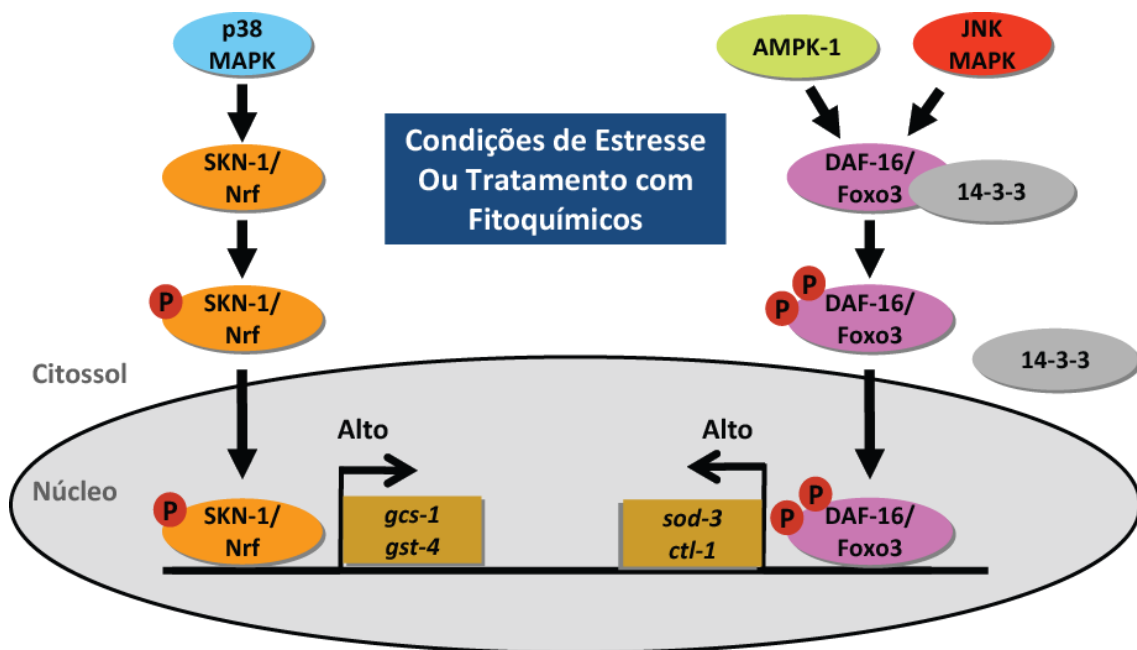


Figura 3. Regulação de SKN-1/FOXO

Fonte: Inoue *et al.* (2005); Landis & Murphy, (2010).

1.7.2 A via de sinalização de DAF-2/Ins/IGF-1

Em *C. elegans*, a via de sinalização da insulina/IGF-1 controla vários processos biológicos tais como longevidade, reserva lipídica, reprodução, resposta ao estresse, termotolerância, resistência a patógenos, metabolismo e autofagia (LEE *et al.*, 2003). Esta via é iniciada pelo receptor DAF-2, o homólogo do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em mamíferos. Quando DAF-2 é ativado fosforila a fosfoinositol 3-kinase, AGE-1, gerando PIP3, que por sua vez recruta as kinases AKT-1, AKT-2, SGK-1 e PDK-1 para a membrana plasmática onde PDK-1 fosforila AKT e SGK-1. O complexo AKT-1/AKT-2/SGK-1 fosforila o fator de transcrição DAF-16, sequestrando-o no citoplasma e então prevenindo a ativação ou repressão de genes alvos no núcleo. Inibidores desta cascata incluem DAF-18, o fosfoinositol 3-fosfatase PTEN, que antagoniza AGE-1 pela defosforilação de PIP3, e PPTR-1, uma subunidade reguladora da PP2A que defosforila AKT-1 (LANDIS & MURPHY, 2010). O papel desta via de sinalização na longevidade e metabolismo é conservado em *C. elegans*, *Drosophila* e mamíferos. A via da DAF-2 insulina/IGF1 regula a expressão de várias enzimas de detoxificação, tais como superóxido dismutase (*sod-3*), catalases (*ctl-1* e *ctl-2*) (MURPHY *et al.*, 2003). Mutantes com alelo hipomórfico de *daf-2* são mais resistentes ao estresse oxidativo e possuem um tempo de vida prolongado em 40% comparado com nematóides do tipo selvagem, reforçando a teoria do dano oxidativo do radical livre e o envolvimento da mitocôndria e dos EROs no processo de envelhecimento (VANFLETEREN & DE VREESE, 1995; HONDA & HONDA, 1999). Além da via DAF-2/Ins/IGF1, DAF-16 também pode ser regulado pela interação com as proteínas 14-3-3, AMPK e JNK. Similar a sinalização de FOXO de mamíferos, as proteínas 14-3-3 interagem com DAF-16 e regulam sua distribuição nuclear/citoplasmática. A proteína kinase ativada por AMP (AMPK) ativa DAF-16 pela fosforilação direta. A família JNK é um subgrupo da superfamília MAPK e está associada com a regulação de processos biológicos críticos como o desenvolvimento, apoptose e sobrevivência celular. Em *C. elegans*, a via de sinalização JNK é ativada por diferentes estresses tais como estresse térmico e oxidativo. JNK interage fisicamente e fosforila DAF-16 em um sítio diferente dos sítios de fosforilação de AKT, e esta fosforilação resulta em um aumento da translocação nuclear de DAF-16 (MA, 2010).

1.7.3 *C. elegans* como um modelo para estudos de fitoquímicos

Como apresentado acima, o *C. elegans* é um excelente modelo para identificação rápida de compostos com propriedades biológicas. O *C. elegans* apresenta grandes vantagens em relação à cultura de células, pois ele é um organismo multicelular que permite que a ação dos compostos seja avaliada de uma forma sistêmica, em um organismo. Além disso, o cultivo e os experimentos realizados com este organismo são muito mais baratos comparados com camundongos ou outro modelo mamífero. Isto se deve principalmente porque no caso do *C. elegans*, o requerimento de animais não é limitante, pois eles crescem rapidamente em um sistema simples e barato onde podem ser gerados milhares de animais em alguns poucos dias. Além disso, o fato do seu genoma já ser conhecido e da disponibilidade de mutantes para a maioria dos seus genes, o *C. elegans*, permite que os mecanismos da resposta ao estresse oxidativo sejam facilmente investigados *in vivo*.

Devido a todas estas características, vários compostos que aumentam a longevidade e a resistência ao estresse oxidativo têm sido estudados neste organismo: Extratos de mirtilo “blueberry” ricos em polifenóis (WILSON *et al.*, 2006) aumentaram o tempo médio de vida em 28 % e o máximo em 14%; extrato de *Ginkgo biloba*, complexo rico glicosídeos e terpenóides (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007) aumentou a resistência ao estresse oxidativo em 33% (WU *et al.*, 2002); o resveratrol, polifenol abundante nas cascas de uva (BASS *et al.*, 2007) prolonga o tempo de vida de uma maneira dose-dependente (VISWANATHAN, 2005); a quercetina, flavonóide abundante em plantas comestíveis, aumenta a resistência ao estresse oxidativo e o tempo de vida médio em 18% no *C. elegans* (PIETSCH *et al.*, 2009).

Tomando em consideração todas estas informações, decidiu-se estudar os efeitos da carqueja no organismo multicelular *C. elegans*. Além disso, foi investigado possíveis mecanismos envolvidos na resposta aos estresses oxidativo e térmico e na longevidade dos animais tratados com carqueja.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar o *C. elegans* como organismo modelo para investigar os possíveis mecanismos de ação dos compostos presentes no extrato hidroalcoólico de carqueja capazes de alterar a resistência aos estresses oxidativo e térmico e a longevidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extrato hidroalcoólico de carqueja (EHC);
- Avaliar os efeitos do tratamento dose-resposta do EHC na sobrevivência do *C. elegans* em condições de estresse oxidativo;
- Avaliar os efeitos do tratamento do EHC na sobrevivência do *C. elegans* em condições de estresse térmico;
- Avaliar os efeitos do tratamento com EHC na sobrevivência do *C. elegans* em condições normais;
- Dosar marcadores bioquímicos de estresse oxidativo (catalase, grupos sulfidrilas totais, proteína carbonilada);
- Verificar o envolvimento de SKN-1 e DAF-16 na resposta antioxidante do *C. elegans* tratado com EHC.

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA

3.1 CEPAS E LINHAGENS

As cepas utilizadas neste projeto foram obtidas pelo *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), University of Minnesota, EUA (<http://www.cbs.umn.edu/CGC>) ou pelo Dr. T. Keith Blackwell do Joslin Diabetes Center, Boston, EUA. Foi utilizada a linhagem tipo selvagem N2 Bristol, os mutantes de deleção “knockout” *sek-1(km4)*, *skn-1(zu67)* e *daf-16(mgDf47)* e as linhagens transgênicas com genes repórter N2 *Is007[SKN-1B/C::GFP]* e N2 *zIs356[DAF-16::GFP]*.

Também foram usados animais “knocked down” para *skn-1* obtidos por interferência de RNA (RNAi) (TULLET *et al.*, 2008). A incorporação do RNA fita dupla (dsRNA) nos vermes é feita através de um sistema bacteriano. Para tal, um fragmento exônico do gene alvo é clonado no plasmídeo pL4440 (distribuído gratuitamente por Andrew Fire) que é específico para síntese de dsRNA por indução com IPTG (KAMATH *et al.*, 2001). Para o silenciamento de *skn-1*, o plasmídeo foi construído através da subclonagem de um fragmento obtido por PCR do cDNA de *skn-1* (WALKER *et al.*, 2001) no plasmídeo pPD129.36 (cedido gentilmente por Andrew Fire). O plasmídeo pL4440 sem nenhum inserto foi usado como controle negativo do RNAi. O plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* HT115 e a cultura foi então semeada em placas de petri com NGM contendo IPTG. Os vermes tipo selvagem no estágio larval 1 (L1) foram então cultivados nestas placas e utilizados nos experimentos após 48h a 20°C quando atingiram estágio L4. A confirmação da redução da expressão de *skn-1* foi feita deixando os mesmos animais descritos acima atingirem a fase adulta. Na ausência de *skn-1* os embriões colocados por eles não eclodem.

3.2 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DO C. ELEGANS

As cepas foram mantidas congeladas até o momento de uso. O congelamento é feito transferindo animais L1 para uma solução 1:1 de M9 (22 mM KH₂PO₄; 42 mM Na₂HPO₄; 85,5 mM NaCl; 1 mM MgSO₄) e solução de congelamento (50 mM Tampão Fosfato; 100 mM NaCl; 30% de glicerina). Alíquotas desta mistura foram colocadas em tubos de 1,5 mL e armazenadas no freezer -80°C. Quando necessário, as cepas utilizadas foram descongeladas e transferidas para o meio NGM (Nematode Growth

Médium) (BRENNER, 1974) semeados com *E. coli* OP50 como alimento e incubada a 20°C, o que permitiu o desenvolvimento do ciclo de vida normal. A manutenção das cepas foi feita transferindo animais em diferentes estágios para novas placas à medida que a camada de bactéria ficava escassa.

3.3 SINCRONIZAÇÃO CRONOLÓGICA DO *C. ELEGANS*

Para os experimentos de resistência ao estresse oxidativo, térmico e longevidade, os animais tiveram sua idade sincronizada. A sincronização para a maioria das cepas foi feita através da lise alcalina. A lise alcalina se baseia no tratamento de hermafroditas adultos grávidos com solução de lise (50% de hipoclorito de sódio; 2,5 mM NaOH). Os embriões resistentes a este tratamento foram coletados e colocados em meio líquido M9 de um dia para o outro na ausência de alimento. Isto permite que os embriões eclodam, mas permaneçam estacionários em L1. Os animais L1 foram então transferidos para placas NGM semeadas com *E. coli* OP50 por 48h a 20°C, tempo necessário para o *C. elegans* chegar a L4. Somente para os mutantes *skn-1* a sincronização foi feita por ovoposição. Neste caso, cerca de 50 a 100 mutantes grávidos foram transferidos para placas com ou sem tratamento durante 4 horas, tempo suficiente para que cada animal colocasse certa quantidade de embriões no mesmo estágio de desenvolvimento. Após esse período os vermes adultos eram retirados das placas.

3.4 EXTRATO DE CARQUEJA

3.4.1 Coleta do material botânico

As partes aéreas de *B. trimera* foram coletadas em janeiro de 2010, na cidade de Mariana, Minas Gerais, Brasil. A espécime de exsicata OUPR 24050, foi identificada pela Professora Doutora Viviane R. Scalon e em seguida depositada no Herbário José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.4.2 Preparo do extrato hidroalcoólico de carqueja (EHC)

Após identificação, as partes aéreas da planta foram secas em estufa ventilada e em seguida pulverizadas em moinho mecânico e armazenadas em frascos de plástico. Na obtenção do extrato hidroalcoólico, a planta foi submetida à extração com água destilada e álcool 70% na proporção de 1:1 durante 24 h. Em seguida realizou-se a filtração a vácuo e a evaporação do solvente no rotavapor. A metodologia adotada para a confecção do extrato, com algumas modificações, foi baseada no trabalho de Pádua *et al.* (2010).

3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.5.1 Preparação das placas NGM contendo EHC

O extrato hidroalcoólico de carqueja foi diluído em solução basal obtendo-se as concentrações de 0,5, 5 e 50 mg/mL no volume final. A *E. coli* OP50 cresceu em meio LB líquido até OD (densidade ótica) igual a 1,0, e logo após foi centrifugado para se obter um pellet de bactéria. Este foi ressuscitado com as diferentes concentrações do EHC diluído em solução basal (0,1 M NaCl, 50 mM tampão KPO₄) acrescido de 10 mM MgSO₄ e semeado nas placas contendo NGM. Como controle foi utilizado o pellet da bactéria OP50 ressuscitado em quantidade proporcional de solução basal e MgSO₄.

3.5.2 Ensaio de resistência ao estresse oxidativo

Para o tratamento, larvas L1 sincronizadas foram colocadas em placas contendo ou não o extrato de carqueja e deixadas crescer por 48h a 20°C até o estágio L4. Para testar se o tratamento com carqueja promove um aumento na resistência ao estresse oxidativo, os animais tratados ou não com carqueja foram transferidos para solução de M9 contendo 5 e 7,5mM de tert-butil peróxido (*t*-BOOH), um análogo do peróxido de hidrogênio mais estável em meio líquido. Os experimentos foram realizados em placas de 24 poços, onde 50 animais por grupo foram distribuídos em 5 poços com 10 animais por poço. A viabilidade dos animais foi analisada após 6, 9, 12 e 15 horas usando uma

lupa estereoscópica para contar o número de animais mortos, que são determinados pela ausência de batimento faríngeo e de movimento quando provocados com uma alça de fio de platina (LITHGOW *et al.*, 1995).

3.5.3 Ensaio de Resistência ao estresse térmico

Para testar a resistência ao estresse térmico, vermes com idade sincronizada foram mantidos em tratamento ou não até o quinto dia de vida adulta. Em seguida, cerca de 60 animais de cada grupo foram transferidos para três novas placas com ou sem EHC contendo 20 animais em cada, e mantidos a 35°C. A sobrevivência foi verificada após 6, 9 e 12 horas, usando lupa estereoscópica. Animais que morreram por dissecação nas laterais das placas foram desconsiderados nas contagens.

3.5.4 Ensaio de longevidade

Para os ensaios de longevidade as placas de NGM foram preparadas com 10 mM FUdR (5-Fluoro-2'-deoxyuridine). FUdR é normalmente fosforilado nas células em fluorodeoxiuridilato, um inibidor competitivo da enzima timidilato sintetase que converte deoxiuridilato em timidilato. Desta forma a replicação do DNA é rapidamente interrompida uma vez que esta é a única via de síntese de timidilato nas células. Após atingirem a fase adulta, as únicas células a se duplicarem no *C. elegans* são as germinativas. Assim, animais adultos mantidos em placas contendo FUdR não produzem nenhuma progênie e quaisquer embriões produzidos nesta condição não se desenvolvem. Após a solidificação das placas NGM acrescidas de FUdR, estas foram semeadas com *E. coli* OP50 com ou sem EHC como descrito anteriormente.

Os ensaios de longevidade foram iniciados com 60 animais por grupo sincronizados em L4. Os 60 animais foram divididos em 3 placas contendo 20 animais em cada. Estes são cultivados a 20°C ou 25°C por todo seu tempo de vida em placas NGM com FUdR com ou sem extrato de carqueja. A sobrevivência dos vermes foi verificada diariamente.

3.6 DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Além da análise da resistência ao estresse também foi verificada a capacidade antioxidante dos *C. elegans* tratados e não tratados com extrato de carqueja através da medida dos níveis de proteína carbonilada e grupo sulfidrilas totais e da atividade da enzima catalase. As medidas de catalase e sulfidrilas totais foram feitas a partir de uma cultura de 5.000 animais e de proteína carbonilada de uma cultura de 10.000 vermes, todos sincronizados em estágio L4. Após a lise e trituração dos animais, o extrato foi submetido às análises citadas acima. Estes experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

3.6.1 Dosagem dos níveis totais dos grupos de sulfidrilas totais

Foi utilizado o método de Ellman para a execução destas técnicas (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Este método baseia-se na reação de grupos tióis com o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitro-benzóico (DTNB) formando um ânion do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico que é medido espectrofotometricamente a 412 nm.

Para cada 120 µL de amostra, foi adicionado 720 µL de metanol, 150 µL de Tris-HCl, pH8,2, 50 µL de DTNB (ácido 6,5 ditiobis 2-nitrobezóico). Esta mistura foi centrifugada a 10.000g durante 15 minutos à temperatura ambiente. As absorbâncias das amostras foram lidas em 412nm, a 25°C. A concentração de sulfidrilas foi feita através da regressão linear usando cisteína como padrão. Todas as concentrações foram obtidas em µmol/proteína.

3.6.2 Dosagem da atividade da catalase

A determinação da atividade da enzima catalase, foi realizada baseando-se na sua capacidade de converter o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi, (1984). 5000 animais L4 foram homogeneizados com 0,5 mL de 100 mM tampão fosfato pH 7,2 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra

biológica. Em um tubo de polipropileno colocou-se 50 μL de 100 mM tampão fosfato pH 7,2 e 40 μL de água destilada. Em seguida adicionou-se 100 μL da amostra e 810 μL de 10 mM H_2O_2 . As absorbâncias das amostras foram lidas a 240nm a cada minuto, durante cinco minutos. 1U de catalase é equivalente a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em Unidade por mg de proteína. Calculamos a atividade da catalase segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada nessa expressão é o delta obtido das cinco absorbâncias lidas (absorbância final –absorbância inicial / 5).

3.6.3 Dosagem dos níveis de proteína carbonilada

A oxidação de proteínas por EROs leva à formação de derivados carbonilados. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP). O DNP reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. A determinação da concentração sérica de proteína carbonilada foi realizada conforme descrito por Levine *et al.* (1994). 10000 animais sincronizados em L4 foram homogeneizados com 0,5mL de 50 mM tampão fosfato pH 6,7 contendo 1mM EDTA. Em seguida centrifugado a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Para cada amostra utilizou-se dois tubos de polipropileno, um foi denominado de Amostra (A) e outro de Controle (C). Transferiu-se 400 μL de homogeneizado para cada tubo (amostra (A) / controle (C)). Em seguida foi adicionado aos tubos 400 μL de TCA 10% e misturado no vórtex, logo após, foram centrifugados (tubo A e C) à 5000 g por 10 minutos a 4°C. O próximo passo foi adicionar ao tubo A 500 μL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) e no tubo C 500 μL de 2,5 M HCL. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos, e a cada 15 minutos eram misturados no vórtex. Em seguida foram adicionados 500 μL de 10% ácido tricloroacético (TCA) em cada tubo, misturado no vórtex e centrifugados à 5000g por 10 minutos a 4°C. Depois de centrifugados, o sobrenadante dos tubos foi descartado e 1 mL de mistura de etanol com acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex. Uma nova centrifugação foi realizada. Em seguida o sobrenadante dos tubos A e C foram descartados e à estes

foram adicionados mais 1 mL da mistura etanol e acetato de etila, foram misturados no vórtex e novamente centrifugados. No final das centrifugações, o sobrenadante dos tubos A e C foram novamente descartados e adicionado em ambos 1 mL de 6% SDS, misturados no vórtex e centrifugados à 10000g por 10 minutos à 4°C. Finalmente o sobrenadante dos tubos foram retirados e transferidos para cubeta, onde foram lidos no espectrofotômetro à 370nm. A concentração de proteína carbonilada foi determinada utilizando a equação: $A = C.b.\epsilon$, onde A é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle), C é a concentração, b é o caminho óptico e ϵ é o coeficiente de extinção molar. O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado usando o coeficiente de extinção molar de $22\ 000\ M^{-1}.cm^{-1}$ e expresso por nmol de proteína carbonilada formada por mg de proteína. Para se obter a concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais este parâmetro foi determinado pelo método de Lowry (descrito a seguir).

3.6.4 Dosagem de proteínas totais

O método de dosar proteína Lowry é um ensaio muito confiável e amplamente usado. Este método foi descrito a primeira vez por Lowry *et al.* (1951). O método de Lowry é baseado nas ligações das proteínas, que em meio alcalino, com os íons cobre (Cu^{2+}) formam uma cor azul que é dependente em partes, do índice de tirosina e triptofano da amostra, já que os íons cobre catalisam a oxidação de aminoácidos aromáticos.

Em um tubo de polipropileno, foram pipetados 100 μ L de amostra. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100 μ L de água destilada. Posteriormente foi adicionado 1 mL do reagente C em todos os tubos. A mistura foi levada ao vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada tubo, 100 μ L do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 660nm.

Para o cálculo de proteínas totais foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão de albumina (Eixo Y) x absorbância do padrão de albumina (Eixo X). Após regressão linear, foi determinada a equação da reta com a seguinte característica: Concentração = a x Absorbância + b. Esta equação foi utilizada para determinar a

concentração de proteínas totais nos homogenatos de *C. elegans*. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

Os reagentes utilizados e forma de preparo estão descritos a seguir. Reagente A: foi dissolvido 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. Reagente B: Foi dissolvido 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada. Reagente C: Foi adicionado 1 mL do reagente A em 50 mL do reagente B. Reagente D: Foi dissolvido 1 mL de Folin-Ciocateau em 1 mL de água destilada.

3.7 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE SKN-1 E DAF-16

Para investigar se o extrato de carqueja ativa a localização nuclear dos fatores de transcrição SKN-1 e DAF-16 foram utilizadas as cepas transgênicas N2 *Is007[SKN-1B/C::GFP]* e N2 *zIs356[DAF-16::GFP]*. A cepa N2 *Is007[SKN-1B/C::GFP]* é uma linhagem cujo plasmídeo com gene repórter foi integrado no genoma do *C. elegans*. O plasmídeo contendo o gene repórter é uma fusão traducional da sequência genômica do promotor e do gene *SKN-1* com o gene da proteína fluorescente verde (*GFP*) (AN& BLACKWELL, 2003) (Figura 4A). Esta cepa codifica duas das três isoformas de SKN-1, SKN-1B e SKN-1C, os quais são expressos nos neurônios ASI e no intestino respectivamente (BISHOP; GUARENTE, 2007). A cepa N2 *zIs356[DAF-16::GFP]* é uma linhagem também integrada de um plasmídeo contendo uma fusão traducional da sequência genômica do promotor e do gene *DAF-16* com o gene *GFP* (HENDERSON & JOHNSON, 2001) (Figura 4B). Esta linhagem transgênica codifica a isoforma DAF-16a2 que é expressa na maioria das células do corpo do *C. elegans*, com exceção das células da faringe (HENDERSON & JOHNSON, 2001).

Após o tratamento com extrato de carqueja, os animais transgênicos nos estágios de L2 a L4 foram colocados em lâminas contendo uma fina camada de 2% de agarose, imobilizados com 2% de azida sódica e cobertos com uma lamínula. A localização subcelular dos genes repórteres foi analisada através de um microscópio de fluorescência Leika TM5000, disponível no Núcleo de Pesquisa Básica (NUPEB) da UFOP, usando aumento ocular de 10 vezes e filtro para excitação de 365 nm. A localização foi classificada como baixo, médio ou alto de acordo com a localização predominante do GFP. Baixa indução corresponde à ausência de localização nuclear. Indução média

corresponde à concentração de localização nuclear na região anterior e/ou posterior do intestino. Indução alta corresponde à localização nuclear através de todo o intestino.

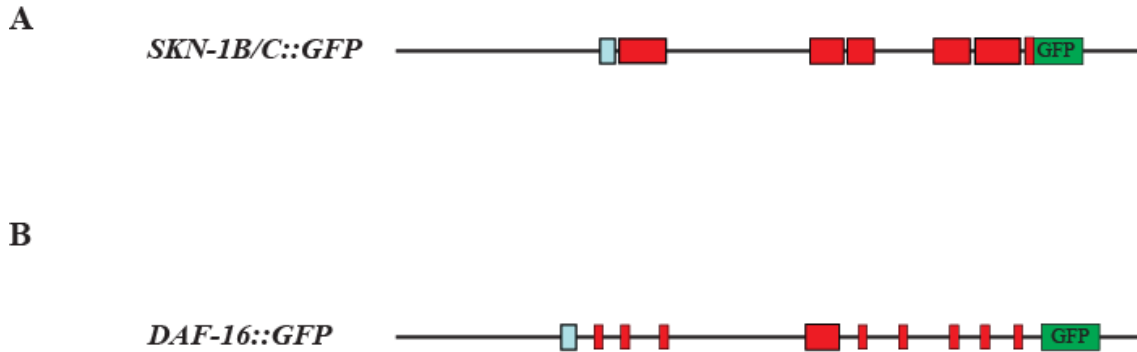


Figura 4 Esquema dos genes repórter para SKN-1 (A) e DAF-16 (B)

Linha sólida representa DNA genômico, caixa de cor azul representa região não traduzida, caixa vermelha representa regiões codificantes e caixa verde representa região codificante para proteína fluorescente verde (GFP).

Fonte Esquema A: Adaptado de An & Blackwell (2003).

Fonte Esquema B: Adaptado de Henderson & Johnson (2001).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios de resistência ao estresse oxidativo e térmico e para as quantificações de marcadores bioquímicos, as análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student's sendo que $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram criadas usando o software GraphPad Prism versão 5 e o valor de p foi calculado através do Mann Whitney test.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Previamente foi demonstrado que o extrato de carqueja possui propriedades antioxidantes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Entretanto, os estudos *in vivo* realizados até o momento se basearam em ensaios utilizando diferentes linhagens celulares de animais modelos. Neste projeto, a propriedade antioxidante do extrato hidroalcoólico de carqueja (EHC) foi avaliada através de uma estratégia sistêmica, ou seja, no organismo como um todo, utilizando o *C. elegans* como modelo. A capacidade antioxidante do EHC foi avaliada através de três ensaios biológicos (sobrevivência em condições de estresse oxidativo, de estresse térmico e em condições normais) e três dosagens bioquímicas (atividade da catalase, níveis de proteína carbonilada e de grupos sulfidrilas totais).

4.1 ANÁLISE DO EFEITO DOSE-RESPOSTA DO TRATAMENTO COM EHC NA SOBREVIVÊNCIA DO C. ELEGANS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Inicialmente, a capacidade antioxidante do EHC no *C. elegans* foi avaliada através de ensaio de resistência ao estresse oxidativo provocado pelo *t*-BOOH. Para caracterizar a extensão dos efeitos do EHC e identificar a concentração ótima do EHC foi realizado um experimento de dose-resposta onde foram testados 0,5, 5 e 50 mg/mL do EHC. A resistência ao estresse oxidativo foi analisada após os animais terem sido tratados por 48 horas com EHC nestas concentrações. A figura 5 mostra a fração de sobreviventes após 6, 9, 12 e 15 horas em 5 mM de *t*-BOOH. Foi observado que após 15 horas do início do estresse, a fração sobrevivente de animais tratados com 5 mg/mL de EHC foi significativamente maior em comparação com animais não tratados ($p \leq 0,05$). Apesar dos dados não terem sido significativos, a sobrevivência dos animais tratados com 0,5 mg/mL de EHC foi aparentemente maior em relação aos animais não tratados porém menor em relação aos animais tratados com 5 mg/mL de EHC. Estes resultados sugerem um possível efeito dose-resposta do tratamento dos animais entre 0,5 e 5 mg/mL de EHC. Por outro lado, o tratamento dos animais com 50 mg/mL não mostrou efeito protetor, já que a sobrevivência destes foram semelhantes ao grupo controle.

Diante destes resultados, o tratamento com 5 mg/mL de EHC foi escolhido como a condição a ser utilizada nos demais experimentos realizados neste trabalho.

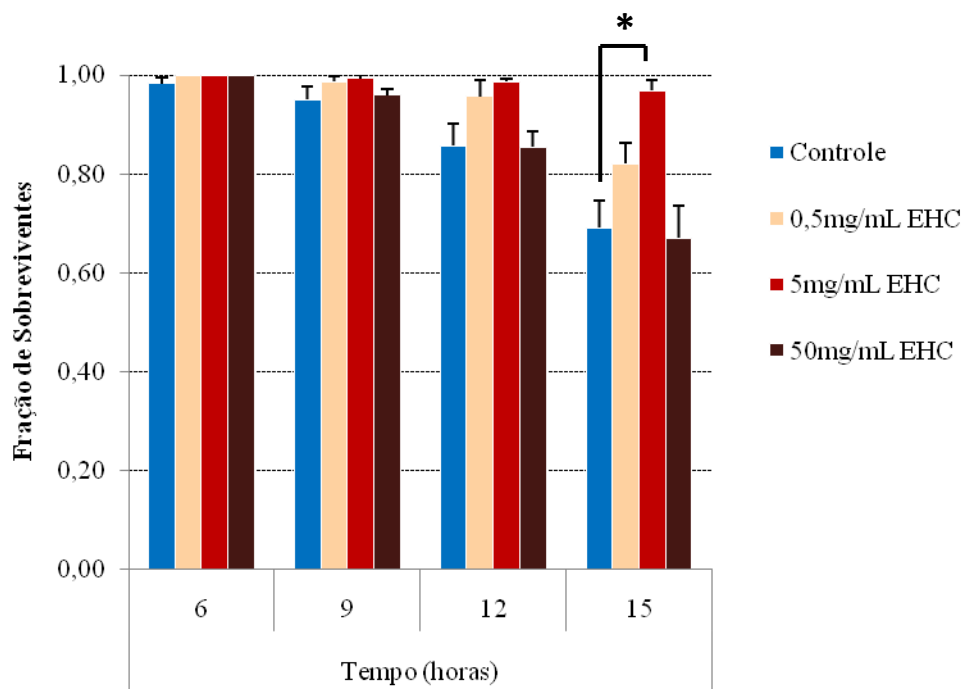


Figura 5. Efeito dose-resposta do tratamento com EHC na sobrevivência do *C. elegans* em condições de estresse oxidativo

Os animais tipo selvagem foram tratados por 48 horas com diferentes concentrações do EHC ou com solução controle. A sobrevivência dos animais em 5 mM de *t*-BOOH foi verificada em tempos determinados. O gráfico acima representa a média de três experimentos. A barra de erros representa o SEM. O símbolo * indica resultado significativo $p \leq 0,05$ através do teste t de Student's.

4.2 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DO *C. ELEGANS* TRATADO COM EHC SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO

A segunda medida para avaliar as propriedades antioxidantes do EHC *in vivo* foi através de um ensaio de resistência ao estresse térmico. Para avaliar a sobrevivência em condições de estresse térmico, os animais foram tratados com 5 mg/mL de EHC desde o estágio L1 até o quinto dia de vida adulta (168 horas de tratamento), fase em que a maior parte da ovoposição já havia cessado, e os vermes eram menos ágeis para escapar da placa nas condições de estresse. Após este período os animais foram submetidos ao estresse térmico por elevação de sua temperatura de cultivo de 20°C para 35°C e a fração de animais vivos foi verificada após 6, 9 e 12 horas. A figura 6 mostra que o tratamento com 5 mg/mL de EHC não foi capaz de aumentar a resistência ao estresse térmico dos animais tipo selvagem em nenhum dos tempos analisados.

4.3 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DO *C. ELEGANS* TRATADO COM EHC SOB CONDIÇÕES NORMAIS

O terceiro ensaio biológico usado para avaliar a capacidade antioxidante do EHC *in vivo* foi a análise da longevidade dos animais em condições normais. Para verificar se o tratamento EHC também aumenta a longevidade do *C. elegans*, foi realizado um experimento onde animais tipo selvagem foram tratados desde L1 por todo o seu tempo de vida com 5 mg/mL de EHC. A figura 5 e Tabela 1 mostram os resultados obtidos de um experimento de longevidade realizado a 20°C (Figura 7A) e dois realizados a 25°C (Figura 7B). Pode se observar tanto na figura 7A e B, que o tratamento com 5 mg/mL de EHC não aumentou nem o tempo de vida médio e nem o máximo dos animais tipo selvagem. O tempo de vida médio tanto dos animais tratados e não tratados a 20°C foi de 22 dias. A 25°C, o tempo de vida médio foi de 8 dias para os animais do grupo controle e 9 dias para o grupo tratado sendo esta diferença não significativa. O tempo de vida máximo foi de 32 dias a 20°C e 15 dias a 25°C para o grupo controle enquanto que o grupo tratado foi de 30 dias a 20°C e 13 dias a 25°C sendo não significantes estas reduções (Tabela 1).

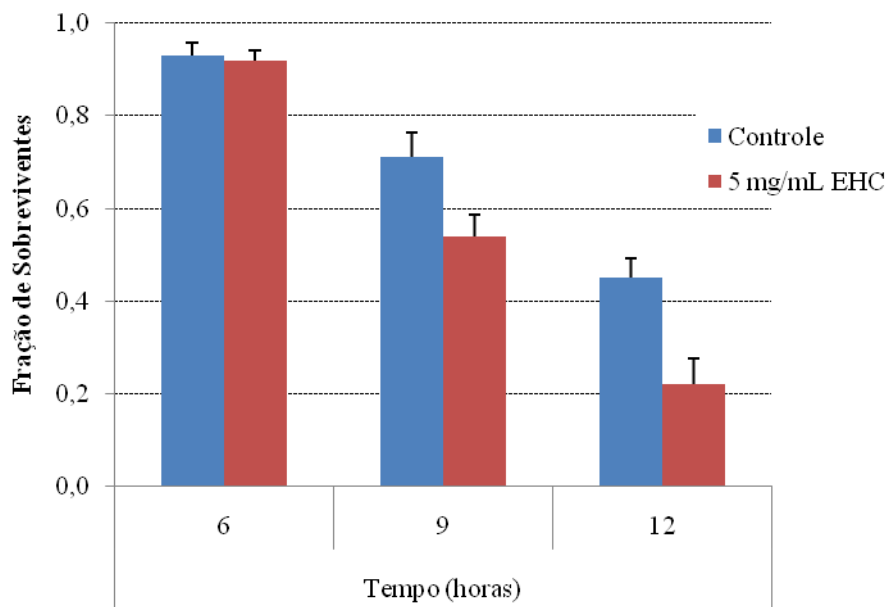


Figura 6. Sobrevivência do *C. elegans* tratado com EHC sob condições de estresse térmico.

Os animais tipo selvagem foram tratados por 168 horas com 5 mg/mL do EHC ou com solução controle. A sobrevivência dos animais a 35°C foi verificada em tempos determinados. O gráfico acima representa a média de três experimentos. A barra de erros representa o SEM.

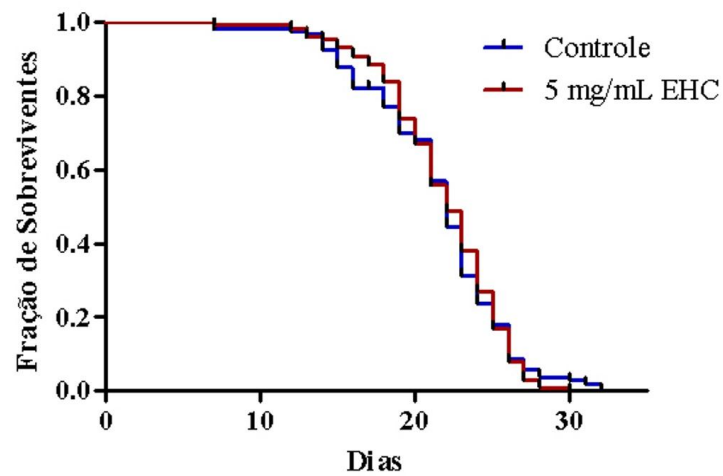
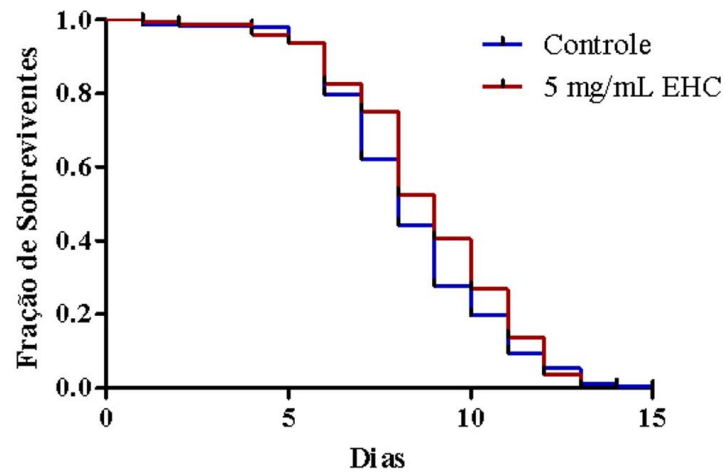
A**B**

Figura 7. Sobrevivência do *C. elegans* tratado com carqueja sob condições normais.

Os animais foram tratados por todo seu tempo de vida com 5mg/mL do EHC ou com solução controle e mantidos à 20° C (A) ou 25°C (B). A sobrevivência foi verificada diariamente. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram criadas usando o GraphPad Prism versão 5.

Tabela 1. Análise da longevidade dos animais tipo selvagem tratados com EHC

	Tempo de vida médio (dias)	Tempo vida máx: (dias)	Valor p em relação ao controle ^a	n ^b	Experimentos
Longevidade a					
20°C					
N2 Controle	22	32		110/124	1
N2 5 mg/mL EHC	22	30	0,227	111/133	1
Longevidade a					
25°C					
N2 Controle	8	15		278/292	2
N2 5 mg/mL EHC	9	13	0,879	243/256	2

^a valor p calculado por Mann Whitney test

^b n representa o número total de animais que morrem por envelhecimento normal contra aqueles no total dos experimentos

4.4 ANÁLISE DE MARCADORES BIOQUÍMICOS E ENZIMÁTICOS NO C. ELEGANS TRATADO COM EHC

O status antioxidante *in vivo* do *C. elegans* tratado com 5 mg/mL de EHC também foi avaliado através de alguns marcadores bioquímicos e enzimáticos. Animais submetidos ou não a 48 horas de tratamento com 5 mg/mL de EHC, foram analisados quanto à atividade da enzima catalase, níveis de sulfidrilas totais e proteínas carboniladas.

Neste experimento não foi observada diferença significativa entre animais controle e tratados em nenhum dos parâmetros dosados (figura 8). Devido a variação entre experimentos, os resultados foram apresentados na forma de níveis relativos onde em cada experimento, o valor obtido para o grupo controle foi considerado como 1 e o valor obtido para o grupo tratamento foi convertido por razão. Após esta conversão foi obtida a média dos níveis relativos das triplicatas experimentais (Tabela 2).

4.5 ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE SKN-1/p38 MAPK NO AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO PELO EHC

As vias de sinalização celulares para genes que afetam a resistência ao estresse oxidativo são bastante conservadas entre *C. elegans* e humanos. O aumento da resistência ao estresse oxidativo no *C. elegans* promovido pelo tratamento com 5 mg/mL de EHC oferece uma oportunidade de usar o poderoso sistema genético do *C. elegans* para testar o mecanismo de ação do EHC.

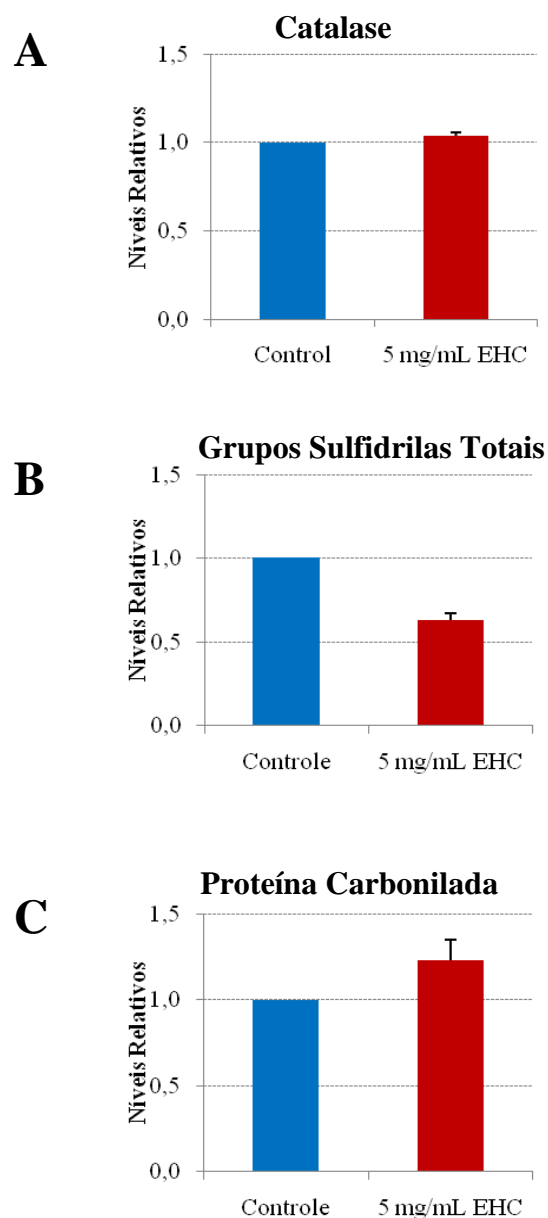


Figura 8. Dosagem dos marcadores bioquímicos e enzimático no *C. elegans* tratado com carqueja.

Os animais tipo selvagem foram tratados por 48 horas com 5 mg/mL de EHC ou com solução controle. Os gráficos acima representam a média de dois experimentos para catalase (A) e média de três experimentos para grupos sulfidrilas totais (B) e proteína carbonilada (C). A barra de erros representa o SEM.

Tabela 2. Efeito do tratamento com 5 mg/mL de EHC sobre a atividade de catalase e os níveis dos grupos sulfidrila totais e proteína carbonilada

Marcador	Controle	5 mg/mL EHC	Níveis relativos em relação ao controle
Catalase (U/mg de P)			
Experimento 1	59,78	61,68	1,031
Experimento 2	14,03	14,87	1,05
Grupos SH^a (μmol/mg de P)			
Experimento 1	1258314	896878,25	-1,4
Experimento 2	171801	128143,21	-1,34
Experimento 3	949287	430194,74	-2,2
Proteína Carbonilada (U/mg de P)			
Experimento 1	175,27	332,33	1,89
Experimento 2	27,77	31,7	1,14
Experimento 3	46,47	61,54	1,32

^a Grupos Sulfidrila Totais

P: proteínas

O controle foi considerado, na razão, sempre 1,0.

Para identificar os possíveis mecanismos de ação do EHC, os efeitos deste foram avaliados em três mutantes de duas importantes vias de sinalização envolvidas no controle da resistência ao estresse oxidativo. Se uma determinada via de sinalização for necessária para o aumento da resistência ao estresse oxidativo observado nos animais tipo selvagem tratados com EHC, espera-se que nos mutantes para esta respectiva via, o tratamento com EHC seja incapaz de aumentar a sobrevivência destes em condições de estresse oxidativo.

4.5.1 Análise da sobrevivência de mutantes *skn-1* e *sek-1* tratados com EHC sob condições de estresse oxidativo

A primeira via de sinalização avaliada foi a de SKN-1/p38 MAPK. No *C. elegans* o fator de transcrição SKN-1 está envolvido na ativação de genes de fase 2 de detoxificação durante estresse oxidativo e na regulação da longevidade em condições normais, de restrição calórica e de sinalização reduzida da insulina (TULLET *et al.*, 2009).

Para averiguar se o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com EHC depende da ativação do fator de transcrição SKN-1, os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando mutantes com expressão reduzida para SKN-1 (knockdown) obtidos através do silenciamento gênico (RNAi). Após 48 horas de tratamento com 5 mg/mL de EHC os animais foram transferidos para solução com 7,5 mM de *t*-BOOH e a fração de sobreviventes foi analisada após 9 horas. Como pode ser observado na figura 9A, os animais *controle(RNAi)* tratados com EHC apresentaram um aumento da resistência ao estresse oxidativo estatisticamente significativo em relação aos animais *controle(RNAi)* não tratados. A fração de animais *skn-1(RNAi)* vivos após 9 horas em 7,5 mM de *t*-BOOH foi muito menor em relação ao grupo *controle(RNAi)*. Não houve diferença estatística entre os animais *skn-1(RNAi)* tratados e não tratados com EHC.

Em condições de estresse oxidativo, a ativação e localização nuclear de SKN-1 depende da via p38 MAPK (INOUE *et al.*, 2005). SEK-1, a MAPK quinase que fosforila PMK-1, o ortólogo da p38 de mamíferos, é necessário para que SKN-1 acumule no núcleo das células intestinais. Para verificar se o aumento da resistência ao

estresse oxidativo promovido pelo tratamento com EHC também depende da via p38 MAPK, os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando mutantes de deleção *sek-1(km4)*.

Na figura 9B observa-se que os mutantes *sek-1* tratados com 5 mg/mL de EHC apresentam uma fração maior de sobreviventes após 9 horas em 5 mM *t*-BOOH em relação ao mutates *sek-1(km4)* não tratados, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,07$).

Estes resultados apresentados acima sugerem que a via de sinalização para genes de fase 2 de detoxificação ativada por SKN-1/p38 MAPK está envolvida no aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido por EHC.

4.5.2 Análise da localização subcelular de SKN-1

Para validar de maneira independente o envolvimento de SKN-1 no aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido por EHC, foi verificado se o tratamento com EHC ativa a localização nuclear de SKN-1. Para tal, foi utilizada uma linhagem transgênica contendo uma fusão traducional do gene *SKN-1B/C* com o gene *GFP* (*SKN-1B/C::GFP*) (AN & BLACKWELL, 2003). Em condições normais, os níveis de *SKN-1B/C::GFP* nas células intestinais é indetectável. Em resposta a vários agentes estressores, pode se observar altos níveis de *SKN-1B/C::GFP* no núcleo das células intestinais (INOUE *et al.*, 2005; AN & BLACKWELL, 2003).

Neste projeto foi testado se as mesmas condições usadas para aumentar a resistência ao estresse oxidativo, ou seja, um tratamento por 48 horas com 5 mg/mL de EHC, também é capaz de induzir a localização nuclear da linhagem transgênica *SKN-1B/C::GFP*. Apesar de termos analisado cerca de 80 animais em três experimentos independentes, não foi possível detectar nenhum animal com localização nuclear (Figura 10). Como controle positivo de indução de localização nuclear de SKN-1, a linhagem *SKN-1B/C::GFP* foi submetida a um tratamento de 10 min com 50 mM de Azida Sódica, já descrito como um potente indutor de SKN-1 (AN; BLACKWELL, 2003, INOUE *et al.*, 2005; AN *et al.*, 2005). Mesmo nestas condições, não foi possível observar nenhum animal com *SKN-1::GFP* localizado no núcleo das células intestinais

(Figura 10). Estes resultados infelizmente sugerem que existe um problema com a linhagem *SKN-1B/C::GFP*.

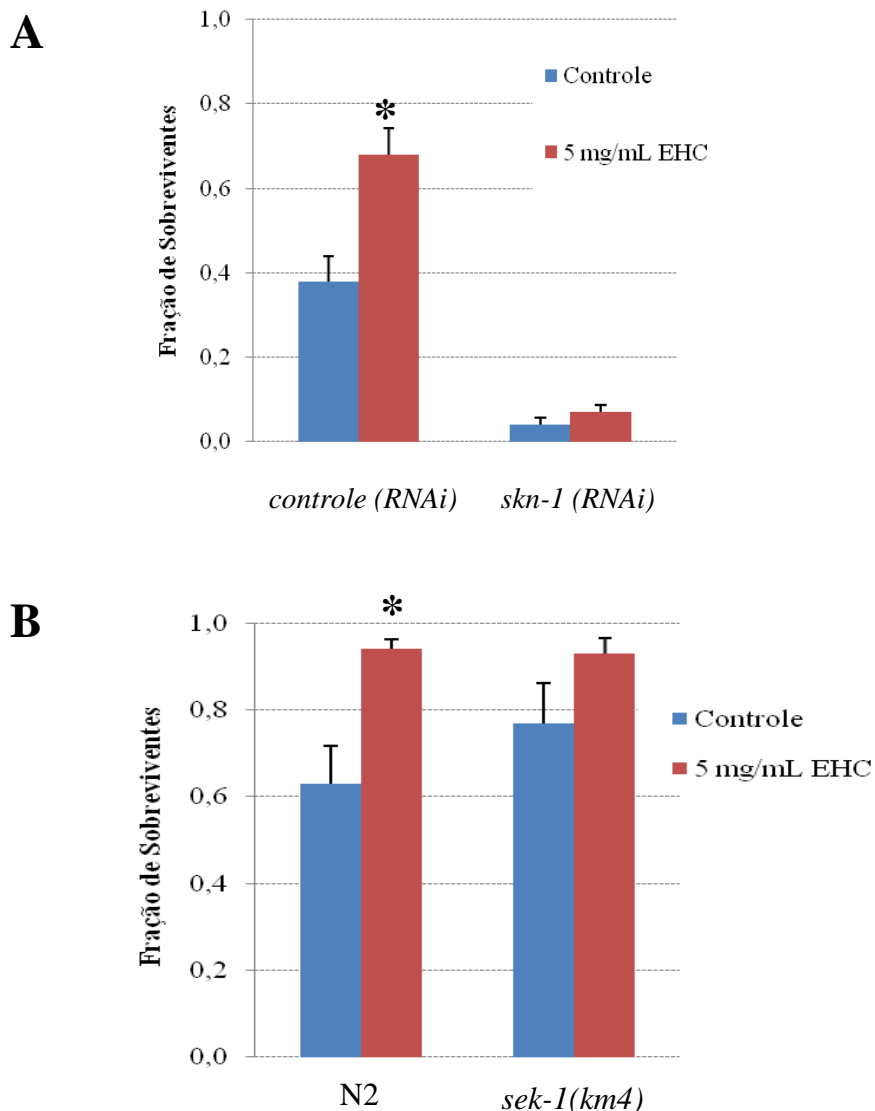


Figura 9. Sobrevivência de mutantes para SKN-1 e SEK-1 tratados com carqueja sob condições de estresse oxidativo.

Os animais foram tratados por 48 horas com 5 mg/mL do EHC ou com solução controle. A sobrevivência dos animais foi verificada 9 horas após o início do estresse. (A) Representa a média de três experimentos para *skn-1(RNAi)* em 7,5 mM de *t*-BOOH. (B) representa a média de três experimentos para os mutantes de deleção *sek-1(km4)* em 5 mM de *t*-BOOH (b). A barra de erros representa o SEM. O símbolo * indica resultado significativo $p \leq 0,05$ através do teste t de Student's.

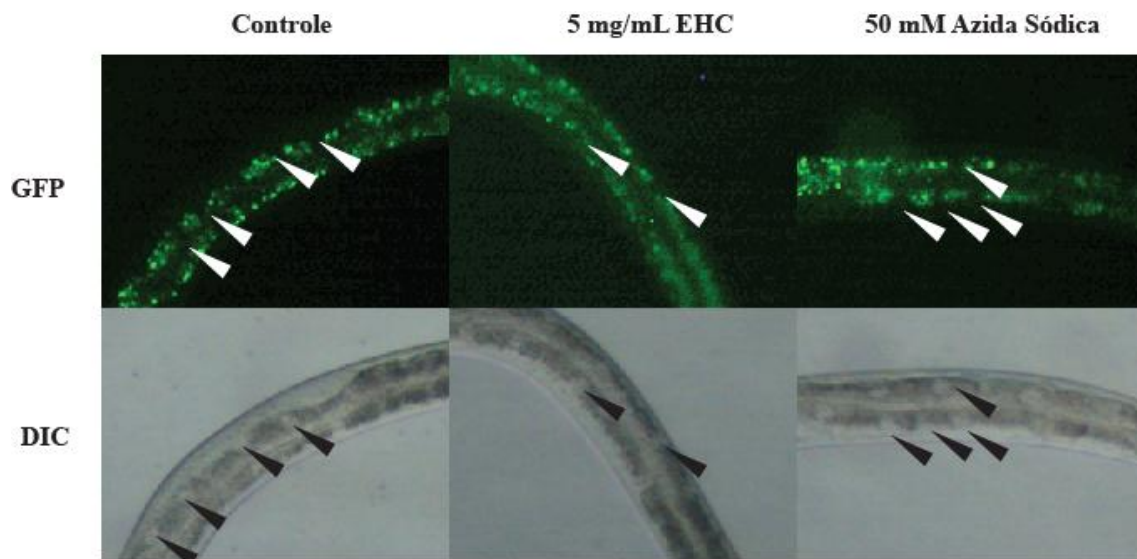


Figura 10. Localização subcelular de *SKN-1B/C::GFP* em animais tipo selvagem tratados com carqueja.

A linhagem transgênica N2 IS 007 (*SKN-1B/C::GFP*) foi tratada por 47-48 horas com 5 mg/mL do EHC ou com solução controle ou por 10 min com 50 mM de azida sódica como descrito por An e Blackwell (2003). GFP, proteína fluorescente verde; DIC, contraste de interferência diferencial. As setas apontam para o núcleo das células intestinais

4.6 ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DAF-16 NO AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO PELO EHC

A segunda via de sinalização avaliada foi a de DAF-16. O fator de transcrição DAF-16 promove a expressão de uma série de genes que codificam enzimas antioxidantes e de detoxificação em condições de sinalização reduzida da insulina e de estresse (LANDIS & MURPHY, 2010).

4.6.1 Análise da sobrevivência de mutante *daf-16* tratado com EHC sob condições de estresse oxidativo

Para averiguar se o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com EHC também depende da ativação do fator de transcrição DAF-16, os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando mutantes de deleção *daf-16(mgDf47)*. Após 48 horas de tratamento com 5 mg/mL de EHC os animais foram transferidos para solução com 5 mM de *t*-BOOH e a fração de sobreviventes foi analisada após 9 horas. Como pode ser observado na figura 11, os mutantes *daf-16(mgDf47)* tratados com EHC não apresentaram um aumento da resistência ao estresse oxidativo estatisticamente significativo em relação aos mutantes não tratados.

Este resultado sugere que o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido por EHC também depende de DAF-16.

4.6.2 Análise da localização subcelular de DAF-16

O envolvimento de DAF-16 no aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido por EHC também foi avaliado através da ativação da sua localização nuclear. A localização subcelular de DAF-16 foi realizada utilizando linhagem transgênica contendo uma fusão traducional do gene DAF-16 com o gene *GFP* (*DAF-16::GFP*) (HENDERSON & JOHNSON, 2001). Em condições normais, *DAF-16::GFP* se encontra no citoplasma de quase todas as células do corpo do *C. elegans*. Em resposta à vários agentes estressores, *DAF-16::GFP* se acumula no núcleo destas células (LANDIS&MURPHY,2010).

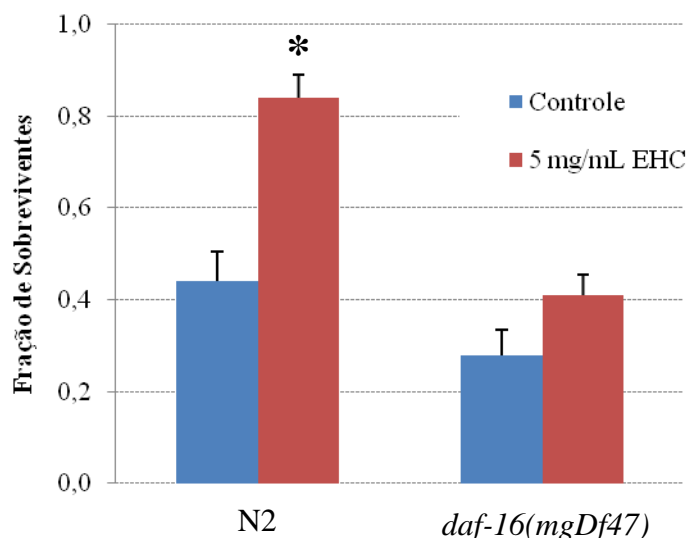


Figura 11. Sobrevivência do mutante para DAF-16 tratado com carqueja sob condições de estresse oxidativo.

Os animais foram tratados por 48 horas com 5 mg/mL EHC ou com solução controle. A sobrevivência dos animais em 5 mM de t-BOOH foi verificada 9 horas após o início do estresse. O gráfico acima representa a média de dois experimentos. A barra de erros representa o SEM. O símbolo * indica resultado significativo $p \leq 0,05$ através do teste t de Student's.

O tratamento dos animais transgênicos com 5 mg/mL de EHC por 48 horas não foi capaz de induzir a localização nuclear de *DAF-16::GFP*. Já os animais tratados por 10 min com 50 mM de Azida Sódica apresentaram localização nuclear em cerca de 50% dos animais analisados (Figura 12).

Os resultados relacionados à sobrevivência de mutantes em condições de estresse acima sugerem que EHC aumenta a resistência ao estresse oxidativo de uma maneira SKN/p38 MAPK e DAF-16 dependente. Porém as análises de genes repóteres realizadas até o momento não corroboraram estas observações.

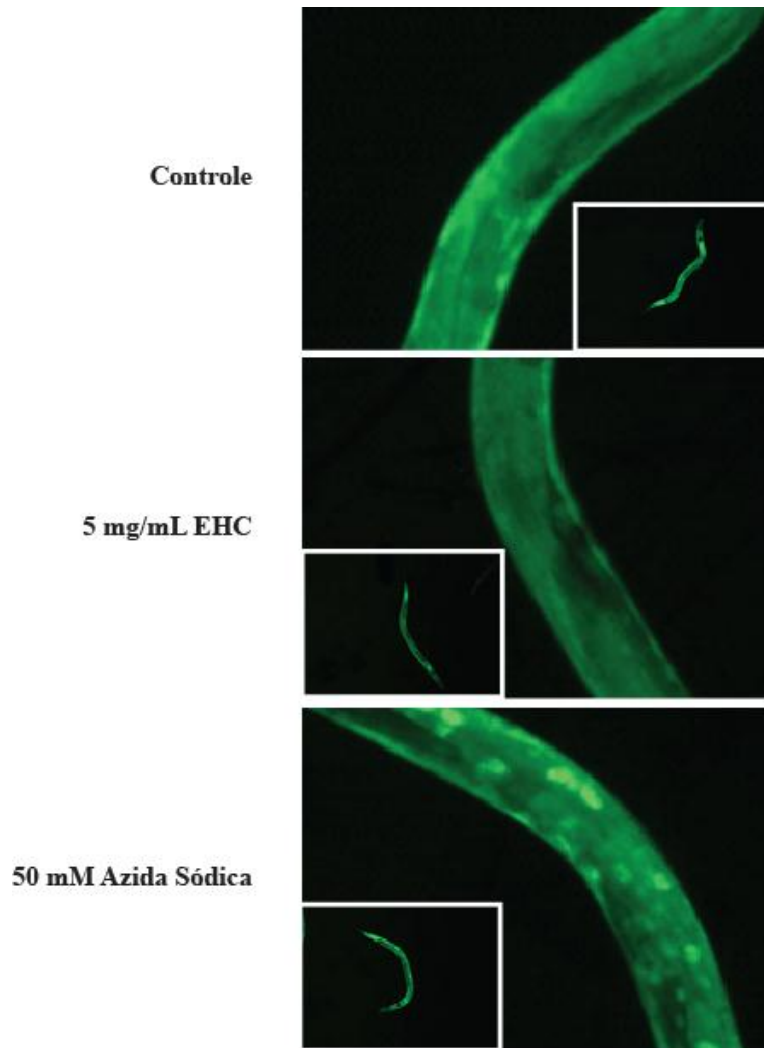


Figura 12. Localização subcelular de *DAF-16::GFP* em animais tipo selvagem tratados com EHC

A linhagem transgênica N2 *Is[DAF-16::GFP]* foi tratada por 47-48 horas com 5 mg/mL do EHC ou com solução controle ou por 10 min com 50 mM de azida sódica como descrito por (B). O quadro marcado com linha branca mostra a foto do animal completo.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA *B. TRIMERA* NO *C. ELEGANS*

A flora brasileira é rica em espécies com princípios ativos de importância terapêutica, com potencialidades não apenas de utilização na medicina natural como também na agricultura natural no controle integrado de pragas e doenças de plantas cultivadas. Muitas espécies de plantas medicinais contêm fenóis, quinonas, saponinas, flavanóides e terpenóides em quantidades apreciáveis de repelir insetos, também exercer atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antifúngicas e etc (SILVA JR; VIZZOTO, 1996). Desta forma, a flora brasileira é alvo de grande interesse pelas indústrias farmacêuticas, na tentativa de descoberta de novos medicamentos para o arsenal terapêutico ou agropecuário. Mas para identificar um composto natural com propriedades biológicas de interesse é necessário investigar as suas propriedades tanto *in vitro* assim como avaliar as suas funções em sistemas biológicos *in vivo*.

O estresse oxidativo contribui para a etiologia de várias doenças degenerativas como isquemia e processos de envelhecimento, então foi sugerido que compostos que eliminem os EROS, seja por ação direta ou indireta, podem prevenir ou ao menos retardar estes processos. A identificação de uma classe de compostos químicos que retardam o envelhecimento é altamente desejável tanto como instrumento para futuras pesquisas, mas também como potencial terapêutico para retardar as doenças relacionadas à idade.

A carqueja (*B. trimera*) é rica em compostos antioxidantes capazes de eliminar estes radicais livres. Trabalhos realizados com *B. trimera* relatam que esta espécie apresenta propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* (TORRES *et al.*, 2000; JANUÁRIO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PAUL *et al.*, 2009; PÁDUA *et al.*, 2010). Contudo, nenhum trabalho *in vivo* realizado com *B. trimera* demonstrou suas propriedades antioxidantes e pró-longevidade de maneira sistêmica. Nesse contexto, sabendo que o sinergismo pode ser importante para uma terapia mais efetiva o primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antioxidantes globais da *B. trimera* em um organismo multicelular, o *C. elegans*.

5.1.1 Ensaios Biológicos

Inicialmente, a capacidade antioxidante do EHC foi avaliada através de três ensaios biológicos: sobrevivência em condições de estresse oxidativo, de estresse térmico e em condições normais. No ensaio de resistência ao estresse oxidativo ao *t*-BOOH foram testados três diferentes concentrações do EHC (0,5, 5 e 50 mg/mL) a fim de obter a melhor concentração e observar se ocorria um efeito dose-dependente. Um efeito dose-dependente não foi observado entre estas concentrações. Um aumento significativo da resistência ao estresse oxidativo foi observado apenas com o tratamento com 5 mg/mL de EHC. Pádua *et al.* (2010) e Rodrigues *et al.* (2009) demonstraram que extrato de carqueja aumenta a resistência ao estresse provocado por paracetamol e H₂O₂ respectivamente. O aumento da resistência tem sido atribuído aos flavonóides, principalmente a quercetina. Tanto em cultura de células quanto no *C. elegans*, o tratamento com quercetina tem efeitos antioxidantes por aumentar a resistência ao estresse oxidativo dos grupos tratados (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007; KAMPKÖTTER *et al.*, 2008; SAUL *et al.*, 2008; ARREDONDO *et al.*, 2010).

Por outro lado, o tratamento com 50 mg/mL de EHC foi tóxico para o *C. elegans*. Rodrigues *et al.* (2009) mostraram que extrato aquoso *B. trimera* produziu alguns efeitos genotóxicos e mutagênicos em camundongo, estando estes, relacionados ao consumo de altas doses do extrato (1000 e 2000mg/Kg). Pádua *et al.* (2010) também observaram um efeito citotóxico em neutrófilos tratados com 50 ug/mL de EHC. O efeito tóxico da carqueja pode talvez ser atribuído a quercetina, uma vez que o tratamento de células neuronais acima de 25 µM de quercetina foi tóxico (ARREDONDO *et al.*, 2010).

O efeito tóxico do EHC no trabalho de Pádua *et al.* (2010) foi observado em uma concentração 1000 vezes menor que a usada neste trabalho. Isto se deve possivelmente porque as análises foram feitas em um organismo multicelular em comparação a uma linhagem celular. Normalmente, no *C. elegans* a disponibilidade farmacológica de diferentes compostos químicos fica limitada a quantidade ingerida devido à impermeabilidade da cutícula existente neste nematodo (RAND & JOHNSON, 1995), ao contrário do que ocorre em cultura de células nos quais estes compostos podem passar livremente pela membrana ou através de canais e poros.

A toxicidade da carqueja em concentrações maiores é uma questão bastante interessante. Apesar dos flavonóides serem capazes de atuar como antioxidantes diretos, quando ingeridos eles também podem modular a atividade de uma variedade de enzimas xenobióticas tais com a citocromo P450 (McPHERSON; TINGLE; FERGUSON, 2001). É muito comum a geração de compostos mais tóxicos pela P450 (VERMEULEN, 1996). A produção de tais compostos secundários mais tóxicos poderia explicar estes efeitos deletérios do tratamento com maiores concentrações do extrato de carqueja.

O efeito benéfico do EHC em baixa concentração e maléfico em alta concentração sugere que este possui um típico efeito hormético. Hormese ou efeito hormético é o termo utilizado quando uma determinada condição tem efeitos opostos em doses altas e em doses baixas. Já tem sido bastante documentado o efeito hormético de plantas medicinais e de fitoquímicos específicos (RATTNAM, 2006; SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008). Tem sido sugerido que o mecanismo geral de ação dos fitoquímicos seja através da ativação de vias de resposta celular adaptativa ao estresse. De uma perspectiva evolutiva, as propriedades nocivas de fitoquímicos desempenham um papel importante na dissuasão de insetos e outras pragas fitófagas. No entanto, quando ingerido em doses sub-tóxicas, os fitoquímicos induzem uma resposta celular moderada ao estresse. As vias “horméticas” ativadas por fitoquímicos incluem diferentes quinases e fatores de transcrição que induzem a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, proteínas chaperonas, fatores neurotróficos e outras proteínas citoprotetoras. Exemplos específicos de tais vias incluem as vias de sinalização de NF- κ B, Nrf-2/ARE, FOXO, sirtuinas e outras (RATTNAM, 2006; SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008).

Tem sido postulado que compostos que possuem propriedades antioxidantes em sistemas biológicos podem conferir proteção a diferentes condições de estresse. Assim, além da resistência ao estresse oxidativo também foi avaliado se o EHC também aumenta a resistência ao estresse térmico. O *C. elegans* se desenvolve normalmente em temperaturas de 16°C a 25 °C sendo que a sobrevivência da população começa a declinar rapidamente acima de 25°C. Ensaio de termotolerância em *C. elegans* são realizados com bastante frequência para avaliar o efeito de compostos e extratos de plantas (WILSON *et al.*, 2006; BENEDETTI *et al.*, 2008 KAMPKÖTTER *et al.*, 2007;

KAMPKÖTTER *et al.*, 2008; RATTNAM, 2006; SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008; PIETCSH *et al.*, 2009). No presente estudo, o tratamento com EHC não aumentou a sobrevivência do *C. elegans* a 35°C. Nenhum trabalho publicado até o momento avaliou o efeito da carqueja na resistência ao choque térmico a fim de comparação. Apesar de ser desejável que o tratamento com um composto promova resistência a diferentes tipos de estresse nem sempre isto é observado. Por exemplo, Wilson *et al.* (2006) observaram que o extrato de mirtilo (blueberry) aumenta a longevidade e a resistência ao estresse térmico, mas não oxidativo, do *C. elegans*.

A resposta celular ao choque térmico causa desnaturação e agregação protéica e muito dos efeitos fenotípicos e morfológicos deste estresse podem ser explicados pela agregação de proteínas e desequilíbrio da homeostase protéica (HASLBECK *et al.*, 2004). Assim, é possível propor que os efeitos do EHC sejam específicos para aliviar a injúria do estresse oxidativo e não do térmico uma vez que os flavonóides são capazes de neutralizar cátions diretamente. Entretanto, se considerarmos os efeitos observados da quercetina no *C. elegans*, vários trabalhos já foram publicados mostrando que a quercetina aumenta a termotolerância no *C. elegans* (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007; KAMPKÖTTER *et al.*, 2008; SAUL *et al.*, 2008; PIETSCH *et al.*, 2009).

Já existe um grande corpo de evidências mostrando que existe uma forte correlação entre extensão do tempo de vida e a resistência a múltiplos estresses. Pelo fato do EHC ter aumentado a resistência ao estresse oxidativo, também foi avaliado o seu efeito sobre a sobrevivência do *C. elegans* em condições normais. Os ensaios de longevidade foram realizados a 20°C e 25°C. A longevidade do *C. elegans* é afetada pela temperatura (GEMS *et al.*, 1998). Animais crescendo a 25°C possuem uma longevidade mais curta do que aqueles crescendo a 20°C, apesar de ambas temperaturas estarem dentro da faixa normal para *C. elegans*. Independente da temperatura usada, não foi observado um aumento da longevidade, nem no tempo de vida médio e máximo. Apesar da análise da capacidade antioxidante *in vitro* ser uma estratégia promissora para identificar novos compostos com potencial para aumentar a longevidade, nem sempre isto é observado. Através de uma triagem de 34 extratos de plantas, Pun *et al.* (2009) mostraram que nem sempre as propriedades antioxidantes observadas *in vitro* e *in vivo* para os extratos tiveram um efeito na longevidade. Isto sugere que outros fatores

provavelmente podem estar envolvidos no controle da longevidade (GRUBER *et al.*, 2009; PUN *et al.*, 2009).

5.1.2 Dosagens Bioquímicas

Pelo fato da EHC ter propiciado um significativo efeito antioxidante *in vivo* no *C. elegans*, foi avaliado em seguida também seu efeito sobre a atividade de uma enzima antioxidante e sobre os níveis de marcadores de estresse oxidativo.

Em relação à enzima antioxidante, foi avaliada a atividade da catalase. A enzima catalase participa do sistema endógeno de defesa antioxidante, sendo responsável, em conjunto com a enzima superóxido dismutase, pela neutralização de radicais superóxido, nocivos ao organismo, transformando-os em água e oxigênio molecular (SCHAUSS, 2006). A análise da atividade da catalase *in vivo* no *C. elegans* mostrou que o tratamento com ECH não causou nenhuma alteração em relação aos animais não tratados. Estes resultados foram semelhantes aos resultados observados *in vivo* por Pádua (2010). Neste trabalho, ele analisou o efeito do tratamento de 5 ug/mL de EHC por 7 dias na dieta de ratos e também não detectou nenhuma diferença no nível da atividade da catalase. Apesar da concentração e tempo de tratamento usados neste trabalho e por Pádua (2010) serem diferentes, estes resultados sugerem que o EHC não exerce nenhum efeito sobre a atividade da catalase em condições normais. Considerando que a quercetina é um dos principais flavonóides presente na carqueja, é interessante ressaltar que a administração da quercetina isolada na dieta não afetou a atividade de CAT, SOD, GST e GPx no fígado de ratos tratados (YOUSEF *et al.*, 2010).

Além da análise das atividades da catalase como um marcador do status antioxidante, foram também analisados os níveis de sulfidrilas totais e proteína carbonilada como marcadores de estresse oxidativo no *C. elegans*. Os radicais sulfidrilas representam os grupos tióis encontrados em proteínas, na glutathione e em outros compostos de baixo peso molecular. Os tióis podem ser oxidados quando o estresse oxidativo está elevado, tendo assim seus níveis diminuídos (WISDOM *et al.*, 1991). Já os grupos carbonílicos representam o dano oxidativo à proteínas, podendo constituir análise do estado oxidativo do organismo. Para ambos os parâmetros, não foi observada alterações provocadas pelo tratamento com EHC. Pádua (2010) também

relata que o tratamento *in vivo* com 50 µg/mL de EHC não alterou os níveis de proteína carbonilada e de GSH.

Uma justificativa para não ter sido observada quaisquer variação nestas dosagens é porque eles são mais adequados para avaliar alterações em condições de estresse que não foi o caso deste trabalho. É possível supor que uma mudança nestes parâmetros possa ser observada se o tratamento tivesse sido feito com 50 mg/mL de EHC uma vez que este promoveu uma redução da resistência ao estresse oxidativo. Neste caso, poderia ser esperada uma redução dos radicais sulfidrilas e um aumento dos níveis de proteína carbonilada. Outro cenário onde poderia ser observada uma alteração nestas dosagens seria tratar previamente o *C. elegans* com EHC e então submetê-los a uma condição de estresse. Se o tratamento com EHC tiver algum efeito protetor antioxidante, poderia ser esperado que o tratamento prévio com EHC aumentasse os níveis de sulfidrilas totais e reduzisse os níveis de proteína carbonilada em comparação aos animais somente submetidos ao estresse oxidativo. Na realidade, alguns autores relatam que o tratamento com polifenóis não afeta marcadores bioquímicos em relação ao grupo controle (SPADA *et al.*, 2009; YOUSEF *et al.*, 2010). Yousef *et al.* (2010) observaram que o tratamento de ratos com paracetamol reduziu a atividade de SOD, CAT, GST e GPx mas que no grupo de animais tratados com paracetamol e quercetina a atividades destas enzimas foram restauradas para níveis normais de animais não tratados. De maneira semelhante, Spada *et al.*, (2009) mostrou que no homogenato do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos tratados com H₂O₂ a atividade de SOD e CAT estão aumentadas e quando são tratados previamente com a polpa do açaí a atividade destas enzimas retornam para níveis normais do grupo controle.

5.2 MECANISMOS DE AÇÃO DO ECH

As propriedades biológicas de extratos de plantas e flavonóides têm sido intensamente investigada *in vitro* e em sistemas *ex vivo* e *in vitro* de mamíferos. Estes compostos e extratos podem agir como anti- ou pró-oxidantes influenciando o sistema redox celular e/ou modulando vias de sinalização (WILLIAMS *et al.* 2004). Por esta razão, os mecanismos de sua ação biológica ainda são objetos de intensa investigação. Neste sentido, o *C. elegans* é um excelente modelo para determinar o potencial protetor

dos flavonóides e extratos vegetais, bem como investigar os mecanismos moleculares da sua ação (WU *et al.*, 2002; SMITH & LUO, 2003; GUTIERREZ-ZEPEDA *et al.*, 2005, BROWN; EVANS; LUO, 2006, WILSON *et al.*, 2006; KAMPKÖTTER *et al.*, 2007). No presente estudo, foi mostrado que o tratamento de *C. elegans* com EHC aumentou a sua sobrevivência em estresse oxidativo, porém sem aumentar a resistência em condições de estresse térmico e em condições normais.

Considerando que os antioxidantes podem atuar diretamente devido a sua capacidade de captar radicais das substâncias ou indiretamente através da modulação de diferentes vias de sinalização levando um aumento da resistência ao estresse oxidativo, o presente trabalho se propôs também tentar elucidar o possível mecanismo de ação da atividade protetora do EHC. Em *C. elegans* dois fatores de transcrição, DAF-16 e SKN-1, promovem a expressão de enzimas antioxidantes ou de detoxificação.

5.2.1 A via de sinalização SKN-1/p38 MAPK

No *C. elegans*, a conservada via de sinalização SKN-1/p38 MAPK é responsável pela ativação de genes de fase II de detoxificação durante estresse oxidativo e na regulação da longevidade em condições normais, de restrição calórica e de sinalização reduzida da insulina (TULLET *et al.*, 2009).

Para investigar se o aumento da resistência ao estresse observado no *C. elegans* tratado com EHC ativa a via de SKN-1/p38 MAPK, os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando os mutantes *skn-1(RNAi)* e *sek-1(km4)*. Os resultados mostraram que os mutantes *skn-1(RNAi)* e *sek-1(km4)* não tiveram a sobrevivência em condições de estresse oxidativo aumentada com o tratamento com EHC. Este resultado sugere que o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido por EHC depende da ativação da via SKN-1/p38 MAPK. Infelizmente, os resultados com *SKN-1B/C::GFP* foram inconclusivos pois, ao que tudo indica, esta perdeu a linhagem transgênica. A análise conjunta destes resultados indica uma aparente contradição uma vez que o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido EHC depende de SKN-1/p38 MAPK, mas ainda falta realizar outros experimentos para corroborar este dado. Além de obter nova amostra do transgênico *SKN-1B/C::GFP*, também se pretende analisar a expressão de genes alvo de SKN-1 tais como *gcs-1* e *gst-4*.

5.2.2. A via de sinalização de DAF-16

O fator de transcrição DAF-16/FOXO ativa a expressão de genes que aumentam a longevidade e a resistência ao estresse (MURPHY *et al.*, 2003).

Os resultados realizados com o mutante *daf-16(mgDf47)* indicam que o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo com EHC também depende de DAF-16. Entretanto, não foi observada a indução de *DAF-16::GFP* com o tratamento de EHC. É possível que o tempo usado para analisar este transgênico não tenha sido o mais adequado, 48 horas desde o estágio L1. Vários autores analisaram a localização subcelular de *DAF-16::GFP* apenas após 1 a 24 horas após a indução (PRZYBYSZ *et al.*, 2009; POWOLNY *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que a quercetina é capaz de aumentar a localização nuclear de *DAF-16::GFP* com após 72 horas com o tratamento de quercetina (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007; KAMPKÖTTER *et al.*, 2008).

Assim, o que pode ser sugerido no presente trabalho é de que EHC aumenta a resistência ao estresse oxidativo de uma maneira SKN/p38 MAPK e DAF-16 dependente. Porém as análises de genes repóteres realizadas até o momento não corroboraram estas observações.

Como não existem dados sobre tratamento de carqueja em *C. elegans* as comparações que podem ser feita se baseiam nos estudos de quercetina. Já foi demonstrado que esta aumenta a resistência ao estresse oxidativo e longevidade e que não depende de *skn-1* e *daf-16* (SAUL *et al.*, 2008; PIETSCH *et al.*, 2009), mas sim de *daf-2*, *age-1*, *sek-1*, e *unc-43* (PIETSCH *et al.*, 2009). Os resultados de Pietsch *et al.* (2009) implicam que a via de sinalização da insulina (IIS) representados por *daf-2* e *age-1*, da p38 MAPK representado por *sek-1* e da via de sinalização da proteína quinase dependente de Ca(+2)-Calmodulina (CaMK) representado por *unc-43* estão envolvidos nas propriedades antioxidantes e pró-longevidade da quercetina observada no *C. elegans*. Se para Saul *et al.* (2008) e Pietsch *et al.* (2009), a resistência ao estresse oxidativo e longevidade modulado pela quercetina não depende de *daf-16* como explicar a localização nuclear de *DAF-16::GFP* observada por Kampkötter *et al.* (2007) e Kampkötter *et al.* (2008)? Já foi demonstrado que a translocação de DAF-16 pode não ser efetiva se cofatores nucleares estiverem faltando (HENDERSON; BONAFÈ; JOHNSON, 2006). Na nossa experiência é necessário ter um critério e um procedimento

metodologia muito bem estabelecido uma vez que na linhagem transgênica de *DAF-16::GFP*, a ativação nuclear desta é facilmente induzida. Por tanto, da mesma maneira que foi sugerido para investigar o envolvimento de SKN-1 no tratamento com EHC, é importante também avaliar a indução de genes efetores de DAF-16 para corroborar os resultados. Esta premissa está em parte de acordo com os achados de Kampkötter *et al.* (2008) que mostrou que a expressão de um alvo de DAF-16, *sod-3*, não é induzida, mas sim reprimida após o tratamento com quercetina.

Alimentos funcionais são um dos segmentos que mais cresce dentro da indústria de alimentos. Este mercado é movido pelo aumento do tempo de vida da população, aumento do custo de assistência á saúde, avanços tecnológicos na produção de alimentos e consciência dos benefícios de uma dieta saudável. Apesar do desenvolvimento de drogas e fármacos ser necessário para tratar de problemas de saúde específicos, a intervenção nutricional através de alimentos funcionais pode ser uma maneira efetiva de melhorar a qualidade de vida. Conseqüentemente, estudo sobre ingredientes alimentares com propriedades antioxidantes é de grande interesse. Assim, é importante avaliar estas propriedades em sistemas biológicos *in vivo*. O *C. elegans* se tornou um organismo modelo central na pesquisa de longevidade e estresse oxidativo. Os motivos que levaram a isto se devem ao fato de ser um organismo multicelular com o genoma já completamente seqüenciado e possuir vias de metabólicas conservadas entre mamíferos, o que permite explorar os mecanismos genéticos que controlam a longevidade e resistência ao estresse. Neste contexto, este trabalho destaca-se por ser o primeiro a avaliar as propriedades antioxidantes do EHC através da abordagem global dos seus efeitos em organismo como um todo mostrando que este aumenta a resistência ao estresse oxidativo e que é possivelmente através de SKN-1 e DAF-16.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

- O tratamento do *C. elegans* com EHC aumenta a resistência ao estresse oxidativo, mas não é dose dependente.
- A concentração de EHC que promoveu a maior resistência ao estresse oxidativo foi de 5 mg/mL.
- O tratamento com 50 mg/mL de EHC foi tóxico pois reduziu a sobrevivência do *C. elegans* em condições de estresse oxidativo em comparação com tratamento de 5 mg/mL.
- O tratamento do com 5 mg/mL de EHC não aumenta a sobrevivência e a resistência do *C. elegans* nem condições de estresse térmico e nem em condições normais.
- O aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo EHC foi dependente das vias de sinalização SKN-1/p36 e DAF-16, uma vez que o tratamento com EHC não aumentou a sobrevivência dos mutantes *skn-1(RNAi)*, *sek-1* e *daf-16* em condições de estresse oxidativo.
- As análises dos genes repórteres *SKN-1B/B::GFP* e *DAF-16::GFP* realizadas até o momento não corroboraram estas observações.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.J. *et al.* Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology*, v. 32, p. 449-503, 1999.

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, v. 105, p. 121-126, 1984.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition*, v. 18, p. 75-81, 2002.

AN, J.H. *et al.* Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proceedings of the National Academic of Science*, v. 102, p. 16275-16280, 2005.

AN, J.H.; BLACKWELL, T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes & Development*, v. 17, p. 1882-1893, 2003.

ARGYROU, A.; BLANCHARD, J.S. Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, v. 78, p. 89-142, 2004.

ARREDONDO, F. *et al.* After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 49, p. 738-747, 2010.

BARBOSA-FILHO, J.M. *et al.* Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 392-413, 2005.

BASS, T. M. *et al.* Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 128, n. 10, p. 546-552, 2007.

BENEDETTI, M.G. *et al.* Compounds that confer thermal stress resistance and extended lifespan. *Experimental Gerontology*, v. 43, p. 882-891, 2008.

BENSASSON, R.V. *et al.* Two-step mechanism of induction of the gene expression of a prototypic cancer-protective enzyme by diphenols. *Chemical Research in Toxicology*, v. 21, p. 805-12, 2008.

BISHOP, N.A, GUARENTE, L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*, v. 447, p. 545-549, 2007.

BÖHL, M. *et al.* Identification of actin as quercetin-binding protein: An approach to identify target molecules for specific ligands. *Analytical Biochemistry*, v. 346, n. 2, p. 295-299, 2005.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 77, p. 71-94, 1974.

BROWN, M. K.; EVANS, J. L.; LUO, Y. Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and [alpha]-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, n. 3, p. 620-628, 2006.

C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, v. 282. p 2012-8, 1998.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais carqueja (*Baccharis genistelloides*). Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, p. 102, 2000.

CASTRO, L.; FREEMAN, B.A. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, v. 17, n. 2, p. 161, 163-5, 2001.

CHOI, S.K. *et al.* Promotion of Met-tRNAⁱMet binding to ribosomes by yIF2, a bacterial IF2 homolog in yeast. *Science*, v. 280, p. 1757–1760, 1998.

CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; MUZYKANTOV, V.R. Antioxidant strategies in respiratory medicine. *Treatemen Respirator Medicine*, v. 5, p. 47–78, 2006.

COLLINSON, E.J. *et al.* The yeast homolog of heme oxygenase-1 affords cellular antioxidant protection via the transcriptional regulation of known antioxidant genes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 3, p. 205-14, 2011.

COOKE, M.S.*et al.* "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." *Faseb Journal*, v. 17, n. 10, p. 1195-214, 2003.

CZYEWSKI, E. *et al.* Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de Carqueja (*Baccharis trimera*) e Vassoura (*Baccharis dracunculifolia*). XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul). FURB, 13 a 15 de novembro de 2008.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T. *et al.* Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academic of Science*, v. 99, p. 11908–11913, 2002.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T. *et al.* Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, p. 4584-9, 2005.

ENIO, C.V. Alimentos Funcionais. *Revista de Medicina de Minas Gerais*, v. 13, n. 4, p. 260-262, 2003.

FAHEY, J.W. *et al.* Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academic of Science*, v. 99, n. 11, p. 7610–7615, 2002.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FORSBERG, H. *et al.* The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Molecular Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 215-228, 2001.

GAMI, M. S.; WOLKOW, C. A. Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan. *Aging Cell*, v. 5, p. 31–37, 2006.

GEMS, D. *et al.* Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 150, p. 129–155, 1998.

GIPP, J.J.; BAILEY, H.H.; MULCAHY, R.T.. Cloning and sequencing of the cDNA for the light subunit of human liver gamma-glutamylcysteine synthetase and relative mRNA levels for heavy and light subunits in human normal tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 206, p. 584–589, 1995.

GOMES, L.J.; GOMES, M.A. Extrativismo e Biodiversidade: o caso da fava d'anta. *Ciência Hoje*, n. 161, p.66-69, 2000.

GONZÁLES, E. *et al.* Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology*, v. 70, p 329-333, 2000.

GRIFFITHS, M.M.; WILLIAMS JR., R.C. In vitro peripheral blood and synovial fluid lymphocyte interactions. *Arthritis and Rheumatism*, 2005.

GRUBER, J. *et al.* Deceptively simple but simply deceptive - *Caenorhabditis elegans* lifespan studies: Considerations for aging and antioxidant effects. *FEBS Letters*, v. 583, n. 21, p. 3377-3387, 2009.

GUTIERREZ-ZEPEDA, A. *et al.* Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *BMC Neuroscience*, v. 25, n. 6, p. 54, 2005.

GUTZEIT, H.O. *et al.* Specific interactions of quercetin and other flavonoids with target proteins are revealed by elicited fluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 318, p. 490-5, 2004.

HAMILTON, D. A novel missense mutation in the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene causes both decreased enzymatic activity and glutathione production. *Blood Journal*, v. 102, p. 725–730, 2003.

HASLBECK, M. *et al.* Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, v. 23, n. 3, p. 638-649, 2004.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U. JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 45, p. 51–88, 2005.

HAYES, M. *et al.* The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Research*, v. 61, n. 8, p. 3299-307, 2001.

HENDERSON, S. T.; JOHNSON, T. E. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, v. 11, n. 24, p. 1975-1980, 2001.

HENDERSON, S.T.; BONAFÈ, M.; JOHNSON, T.E. daf-16 protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. *Journal of Gerontology*, v. 61, n. 5, p. 444-60, 2006.

HONDA, Y.; HONDA, S. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB Journal*, v. 13, p. 1385-1393, 1999.

HU, R. *et al.* Identification of Nrf2-regulated genes induced by chemopreventive isothiocyanate PEITC by oligonucleotide microarray. *Life Science*, v. 79, p. 1944–1955, 2006.

HUNG, T.M. *et al.* Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 108, p. 188-92, 2006.

INOUE, H. *et al.* The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes and Development*, v. 19, p. 2278-2283, 2005.

JANUÁRIO, A. H. *et al.* Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions*, v. 150, n. 3, p. 243-251, 2004.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 8, p.1865–1879, 2006.

JUGE, N.; MITHEN, R.F.; TRAKA, M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 9, p. 1105–1127, 2007.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KAMATH, R.S. *et al.* Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology*, v. 2, 2001.

KAMPKÖTTER, A. *et al.* Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 149, n. 2, p. 314-323, 2008.

- KAMPKÖTTER, A. *et al.* The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological Research*, v. 55, p. 139-147, 2007.
- KOROLKOVAS, A. *Essential of medicinal of chemistry*. 2. ed, New York : John Wiley & Sons, p. 1204, 1988.
- KOVACIC, P.; JACINTHO, J.D. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Current Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 773–796, 2001.
- KWEON, M.H. *et al.* The novel antioxidant 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid induces Nrf2-dependent phase II detoxifying genes and alters intracellular glutathione redox. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 40, n. 8, p. 1349-61, 2006.
- LANDIS, J.N.; MURPHY, C.T. Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. *Developmental Dynamics*, v. 239, n. 5, p. 1405-12, 2010.
- LEE, J.M. *et al.* Identification of the NFE2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 12029-12038, 2003.
- LEVINE, R.L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, v. 233, p. 346-356, 1994.
- LITHGOW, G.J. *et al.* Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proceedings of the National Academic of Science*, v. 92, n. 16, p. 7540-4, 1995.
- LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S.H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research*, v. 21, p. 295– 307, 2004.
- LOWRY, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. *Current Topics in Cellular Regulation*, v. 36, p. 95–116, 2000.
- MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 125, p. 376–393, 2010.
- MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, p. 727–747, 2004.
- MASELLA, R. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 16, p. 577-586, 2005.

- McCORD, J.M. Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 2, p. 307–310, 1986.
- McCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, v. 108, p. 652– 659, 2000.
- McPHERSON, R.A.; TINGLE, M.D.; FERGUSON, L.R. Contrasting effects of acute and chronic dietary exposure to 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ) on xenobiotic metabolising enzymes in the male Fischer 344 rat: implications for chemoprevention studies. *European Journal of Nutrition*, v. 40, n. 1, p. 39-47, 2001.
- MELOV, S. Increased frequency of deletions in the mitochondrial genome with age of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 1419-25, 1995.
- MOSKAUG et al. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 125, p. 315-324, 2004.
- MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, v.10, n. 11, p. 549-57, 2004.
- MULCAHY, R.T. *et al.*. Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 11, p. 7445-54, 1997.
- MURPHY, C. T. *et al.* Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 424, n. 6946, p. 277-283, 2003.
- OH, S.W. *et al.* JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor_DAF-16. *PNAS*, v. 102, n. 12, p 4494-4499, 2005.
- OLIVEIRA, A. C. P. *et al.* Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 102, n. 3, p. 465-469, 2005.
- OLIVEIRA, E.J.; GONTIJO, S.V.; MALUF, W.R., 1999. Cultive carqueja em sua horta. Boletim técnico de hortaliças N° 0271 edição. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Agricultura. Disponível em <http://www2.ufla.br>.
- OLIVEIRA, R. P. *et al.* Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell*, v. 8, p: 524–541, 2009.
- ONKEN B.; DRISCOLL M. Metformin Induces a Dietary Restriction–Like State and the Oxidative Stress Response to Extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS ONE*, v. 5, n. 1, 2010.

OSBURN, W.O.; KENSLER, T.W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutation Research*, v. 659, p. 31-9, 2008.

PÁDUA, B.C. *et al.* Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 129, p. 381–386, 2010.

PAUL, E.L. *et al.* Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of *Baccharis trimera* Aqueous Extract on Induced Pleurisy in Rats and Lymphoproliferation *In Vitro*. *Inflammation*, v. 32, n. 6, 2009.

PIETSCH, K. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology*, v. 10, p. 565-578, 2009.

POWOLNY, A.A. *et al.* The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via skn-1 activation. *Experimental Gerontology*, 2011.

PRZYBYSZ, A.J. *et al.* Increased age reduces DAF-16 and SKN-1 signaling and the hormetic response of *Caenorhabditis elegans* to the xenobiotic juglone. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 130, n. 6, p. 357-69, 2009.

RAMOS-GOMEZ, M. *et al.* Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice, *Proceedings of the National Academic of Science*, v. 98, p. 3410–3415, 2001.

RAND, J.B.; Johnson, C.D. Genetic pharmacology: interactions between drugs and gene products in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Cell Biology*, v. 48, p.187–204, 1995.

RATNAM, D.V. *et al.* Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 189–207, 2006.

RODRIGUES, C.R.F. *et al.* Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125, p. 97–101, 2009.

ROGERS, L.K. *et al.* Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout, *Society of Toxicology*, v. 82, p. 367–373, 2004.

SARKADI, B. *et al.* Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiological Reviews*, v. 86, p. 1179-1236, 2006.

SAUL, N. *et al.* Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved? *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 129, p. 611-613, 2008.

SCHAUSS, A. *et al.* Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart.(Acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, 2006.

- SCHROECKSNADEL, K. *et al.* Tryptophan degradation increases with stage in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, v. 25, p. 334–337, 2006.
- SHARONI, Y. *et al.* Carotenoids and transcription. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 430, p. 89-96, 2004.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 213-219, 1993.
- SILVA JR., A.A.; VIZZOTTO, V.J. Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras. *Agropecuária Catarinense*, v.9, n.1, p.5-8, 1996.
- SIMÕES-PIRES, C.A. *et al.* Isolation and On-line Identification of Antioxidant Compounds from Three *Baccharis* Species by HPLC-UV-MS/MS with Post-column Derivatisation. *Phytochemical Analysis*, v. 16, p. 307–314, 2005.
- SMITH, J.V.; LUO, Y. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *Journal of Alzheimer's Disease*, v.5, n. 4, p. 287-300, 2003.
- SOHAL, R.S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, v. 273, p. 59–63, 1996.
- SOICKE, H.; Leng-Peschlow, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Medica*, v. 53, p. 37-39, 1987.
- SON, T.G.; CAMANDOLA, S.; MATTSON, M.P. Hormetic Dietary Phytochemicals. *NeuroMolecular Medicine*, v. 10, p. 236–246, 2008.
- SPADA, P.D. *et al.* Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. *Journal of Medicinal Food*, v. 12, n. 5, p. 1084-1088, 2009.
- SURH, Y-J.; KUNDU, JK.; NA, H.K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica*, v. 74, p. 1526–39, 2008.
- TORRES, L. M. B. *et al.* Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, v. 55, n. 6, p. 617-619, 2000.
- TULLET, J.M. *et al.* Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell Biology*, v. 132, p 1025-1038, 2008.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions*, v. 160, p 1-40, 2006.

- VANFLETEREN, J.R.; DE VREESE, A. The gerontogenes age-1 and daf-2 determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal*, v. 9, p. 1355-1361, 1995.
- VERMEULEN, P.B. *et al.* Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *European Journal of Cancer*, v. 32A, n. 14, p. 2474-84, 1996.
- VISWANATHAN, M. *et al.* A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Developmental Cell*, v. 9, p. 605-615, 2005.
- WALKER, A.K. *et al.* A conserved transcription motif suggesting functional parallels between *C. elegans* SKN-1 and Cap 'n' Collar-related bZIP proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 22166-22171, 2000.
- WALLACE, D.C.; MELOV, S. Radicals and aging. *Nature Genetics*, v. 19, n. 2, p. 105-106, 1998.
- WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.
- WILSON, M. A. *et al.* Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, v. 5, p. 59-68, 2006.
- WISDOM, S.J. *et al.* Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 165, p. 1701-1704, 1991.
- WU, J. *et al.* Effects of the narrow band gap on the properties of InN. *Physical Review*, v. 66, 2002.
- XU, C.; LI, C.Y.; KONG, A.N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacological Research*, v. 28, p. 249-268, 2005.
- YEN, K.; NARASIMHAN, S.D.; TISSENBAUM, H.A. DAF-16/Forkhead box O transcription factor: many paths to a single Fork(head) in the road. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 14, n. 4, p. 623-34, 2011.
- YOUDIM, K.A.; JOSEPH, J.A. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 30, n. 6, p. 583-594, 2001.
- YOUSEF, M.I. *et al.* Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 11, p. 3246-3261, 2010.
- ZHANG, D.D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metabolism Reviews*, v. 38, p. 769-89, 2006.