

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Centro de Ciências da Matemática e da Natureza – CCMN
Instituto de Química – IQ
Departamento de Bioquímica

Avaliação da Atividade Antioxidante de Compostos de Coordenação de
 Fe^{3+} em *Saccharomyces cerevisiae*

DANIELA DIAS QUEIROZ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Marcos Dias Pereira

Rio de Janeiro

Fevereiro/2017

Avaliação da Atividade Antioxidante de Compostos de Coordenação de
 Fe^{3+} em *Saccharomyces cerevisiae*

Daniela Dias Queiroz

Orientador: Marcos Dias Pereira

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Aprovada por:

Presidente, Dr. Marcos Dias Pereira

Instituto de Química – UFRJ

Dr. André Luiz Souza dos Santos

Instituto de Microbiologia Paulo Góes – UFRJ

Dr. Marcus Fernandes de Oliveira

Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Rio de Janeiro

Fevereiro/2017

Dedico esse trabalho aos meus
pais, Cristina Dias e Mário Márcio Queiroz

Agradecimentos

Existem situações na vida em que é fundamental poder contar com o apoio e a ajuda de algumas pessoas. Para a realização deste trabalho de conclusão, pude contar com várias, e a essas pessoas prestarei, através de poucas palavras, os mais sinceros agradecimentos.

Primeiramente, agradeço à minha mãe, Cristina Dias pelo apoio, incentivo, compreensão, suporte e atenção nas horas em que mais precisei. Sem você, certamente, a trajetória de todos esses anos teria sido muito mais difícil. Não há palavras capazes de descrever o quão importante você é em minha vida.

Ao professor e amigo Marcos Dias Pereira, orientador deste trabalho, pelos seus conhecimentos, sua atenção e sua boa vontade. Agradeço pela oportunidade dada a mim a 4 anos atrás quando coloquei os pés pela primeira vez no LIFE. Foi muita luta e força de vontade para chegar até aqui, mas enfim eu consegui. Muito obrigada, de coração, pelos ensinamentos, por ter confiado a mim a responsabilidade de ajudá-lo a conduzir o LCG e também pelas nossas conversas, sempre em seus devidos momentos.

Ao Mário Márcio Queiroz, meu pai, pela oportunidade, pela garra que sempre demonstrou e pela força de vontade de sempre continuar estudando, o que serviu de incentivo para o presente trabalho e também para minha longa trajetória.

Ao querido amigo e ex-professor Cristiano Jorge Riger, pelos momentos de apoio, carinho, e pelas horas incontáveis que ouvia minhas lamentações e sempre vinha com as melhores colocações. Muito obrigada por sempre acreditar em mim, por me apresentar o universo científico e também ao mala do meu atual orientador. Ele vai rir, rsrs...

À Prof^a. Elis Cristina Araújo Eleutherio, pelos conselhos e colocações durante os seminários do grupo, contribuindo para o bom andamento do trabalho.

Ao meu irmão, Diego, pelo incentivo, apoio e por quase me convencer que sou uma pessoa inteligente, e também mais capaz do que eu acredito ser.

Ao meu grande incentivador, Frederico Castro, agradeço imensamente por todo o apoio, paciência, conselhos, essenciais para que eu não desanimasse diante de alguns obstáculos e pela orientação incansável nos primeiros 2 anos de laboratório.

Aos amigos do LIFE, especialmente a: Daiane Mazzola, Raquel Paredes, Mariana Castela, Germana Rona e Rayne Magalhães pela amizade, torcida, parceria e pelos incontáveis momentos de descontração, tornando minhas tardes mais produtivas e menos cansativas.

Aos amigos do LCG, especialmente a: Leticia Oliveira, Thales Ribeiro, Adriano Carneiro, Débora Oliveira, Daniel Cunha e Marcio Senna pela parceria, ajuda e por sempre estenderem a mão nos momentos em que precisei, seja para um repique, um inóculo, uma autoclavação, enfim, vocês foram essenciais.

Às minhas “Âncoritchas”, Bárbara Bravo, Gabriela Castor, Mariana Noval, Gabriela Capua, Danúzia Rodrigues e Ana Carolina Barbosa (Piu), pela amizade de sempre, e pela compreensão da minha ausência, vocês serão sempre muito importantes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus companheiros e amigos da Escola Carioca de Dança, por tornarem meus dias menos cansativos e mais agradáveis durante esses dois anos, um agradecimento especial aos grupos “Seduzentes” e “Chineleiros”, vocês foram de grande importância para me ajudar a passar por momentos de estresse e irritabilidade.

A minha família pelo valioso apoio emocional;

A todos aqueles que de alguma forma tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Obrigada.

“Nós somos aquilo que fazemos
repetidamente. Excelência, então, não
é um modo de agir, mas um hábito”

Aristóteles

Avaliação da Atividade Antioxidante de Compostos de Coordenação de Fe^{3+} em *Saccharomyces cerevisiae*

Daniela Dias Queiroz

Orientador: Marcos Dias Pereira

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

O uso do oxigênio pelos organismos aeróbios é de grande relevância para diversas funções biológicas. No entanto, esta molécula pode ser o ponto de partida para a formação de outras espécies com maior reatividade. Em geral, o aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) juntamente com a incapacidade do sistema antioxidante das células em eliminar tais moléculas reativas podem levar ao acúmulo de danos oxidativos em lipídios, proteínas e DNA. Neste cenário, o estresse oxidativo tem sido amplamente relacionado com a gênese e/ou progressão de diversas patologias, tais como diabetes, doenças cardíacas e neurodegenerativas, bem como o câncer. Desta forma, com o objetivo de eliminar as EROs, bem como atenuar os efeitos nocivos do estresse oxidativo, diversos grupos de pesquisa estão a investigar o papel de compostos naturais e/ou sintéticos com propriedades antioxidantes. Neste contexto, uma alternativa que vem recebendo grande atenção é o desenvolvimento de compostos de coordenação com atividade redox. Tais compostos são sintetizados para atuarem de forma mimética a catalase (Cat) e superóxido dismutase (Sod), enzimas envolvidas na eliminação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), respectivamente. Neste trabalho, investigamos a capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* mimética a Sod e Cat de 7 compostos de coordenação (C1 - C7) contendo o metal de transição ferro (Fe^{3+}) como centro de coordenação. Além disso, neste estudo também foi possível avaliar a capacidade dos compostos em induzir uma resposta celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Ao avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*, mimética a Sod e Cat, observamos que, enquanto todos os compostos foram capazes de eliminar o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, nenhum dos compostos foi capaz de decompor o H_2O_2 . Diante deste resultado,

empregando *S. cerevisiae* como modelo de estudo, investigamos a capacidade antioxidante dos compostos somente no estresse oxidativo causado pela menadiona, um fonte geradora do $O_2^{\cdot-}$. Embora todos os compostos tenham resgatado integralmente a sobrevivência ao estresse oxidativo e reduzido a disfunção mitocondrial da cepa selvagem de *S. cerevisiae*, apenas 3 compostos (C3, C5 e C7) foram capazes de aumentar em cerca de 70% a sobrevivência de uma cepa de *S. cerevisiae* deficiente na síntese da enzima Sod1. Com relação a capacidade destes 3 compostos em induzir uma resposta celular, foi através da avaliação da sobrevivência da mutante Yap1 (fator de transcrição requerido na resposta contra o estresse oxidativo), da expressão da proteína Hsp104 e da determinação das atividades das enzimas endógenas de *S. cerevisiae*, Sod e Cat, que foi possível observar a capacidade de C3, C5 e C7 induzirem uma resposta celular contra o estresse oxidativo. Para entender se estes compostos estavam sendo absorvidos, avaliamos por ICP-MS a presença do metal ferro no interior das células. O que seria um indicativo de absorção dos compostos, foi comprovado pelo aumento significativo da concentração do metal ferro no ambiente intracelular. Diante dos resultados apresentados podemos concluir que, apesar de todos os compostos (C1 – C7) terem apresentado atividade antioxidante, somente C3, C5 e C7 podem ser considerados bons compostos Sod miméticos. No entanto, a capacidade de indução da resposta celular é um outro mecanismo pelo qual tais compostos podem promover proteção as células.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; compostos de coordenação; atividade antioxidante mimética; superóxido dismutase; catalase; estresse oxidativo.

Evaluation of the Antioxidant Activity of Fe³⁺ Coordination Compounds in *Saccharomyces cerevisiae*

Daniela Dias Queiroz

Orientador: Marcos Dias Pereira

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

The use of oxygen by aerobic organisms is of great relevance for several biological functions. However, this molecule may be the starting point for the formation of other species with higher reactivity. In general, increasing the formation of reactive oxygen species (ROS) together with the inability of the cell's antioxidant system to eliminate such reactive molecules can lead to the accumulation of oxidative damage in lipids, proteins and DNA. In this scenario, oxidative stress has been extensively related to the genesis and/or progression of various pathologies, such as diabetes, heart and neurodegenerative diseases, as well as cancer. Thus, with the aim of eliminating ROS, as well as attenuating the harmful effects of oxidative stress, several research groups are investigating the role of natural and/or synthetic compounds with antioxidant properties. In this context, an alternative that has received great attention is the development of coordination compounds with redox activity. Such compounds are synthesized to mimic catalase (Cat) and superoxide dismutase (Sod), enzymes involved in the elimination of hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide radical (O₂^{•-}), respectively. In this work, we investigated the *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacity of Sod and Cat of 7 coordination compounds (C1 - C7) containing the transition metal iron (Fe³⁺) as the coordination center. Furthermore, in this study it was also possible to evaluate the ability of the compounds to induce a cellular response of *Saccharomyces cerevisiae*. Assessing the *in vitro*, mimetic antioxidant capacity of Sod and Cat, we observed that, while all compounds were able to eliminate the O₂^{•-} radical, none of the compounds was able to decompose H₂O₂. Considering this result, using *S. cerevisiae* as a study model, we investigated the

antioxidant capacity of the compounds only in the oxidative stress caused by menadione, a source that generates $O_2^{\cdot-}$. Although all compounds have fully recovered oxidative stress survival and reduced mitochondrial dysfunction of *S. cerevisiae* wild type strain, only 3 compounds (C3, C5, and C7) were able to increase survival by about 70% of a strain of *S. cerevisiae* deficient in the synthesis of the enzyme Sod1. Regarding the ability of these 3 compounds to induce a cellular response, it was through the evaluation of the survival of the mutant Yap1 (transcription factor required in the response against oxidative stress), the expression of the Hsp104 protein and the determination of the activities of the endogenous enzymes of *S. cerevisiae*, Sod and Cat, which observed the ability of C3, C5 and C7 to induce a cellular response against oxidative stress. To understand if these compounds were being absorbed, we evaluated the presence of iron metal inside the cells by ICP-MS. What would be an indication of absorption of the compounds, it was evidenced by the significant increase of the iron metal concentration inside the cells. In view of the presented results we can conclude that, although all the compounds (C1 - C7) have presented antioxidant activity, only C3, C5 and C7 can be considered good Sod mimics. However, the ability to induce a cellular response, it points to an another mechanism by which such compounds can promote protection of cells.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; mimetic activity; superoxide dismutase; catalase; oxidative stress; coordination compounds;

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1. Estresse oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio.....	2
1.1.1 Danos a biomoléculas provocados por EROs.....	6
1.2. Sistema Antioxidante.....	8
1.2.1 Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1.).....	9
1.2.2 Catalase (EC 1.11.1.6)	12
1.3. Compostos de coordenação: uma alternativa para a redução do estresse oxidativo	15
1.3.1 Princípios básicos da Química Bioinorgânica	15
1.3.2 A relevância dos compostos de coordenação como alternativa terapêutica contra o estresse oxidativo.....	16
1.3.3 Modelos biomiméticos da Superóxido dismutase	18
1.3.4 Modelos biomiméticos da Catalase	19
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de múltiplas propostas	20
1.4.1 Estágios de crescimento.....	21
1.4.2. A resposta de <i>S. cerevisiae</i> ao estresse oxidativo	22
2. Justificativa.....	25
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. Material e Métodos.....	30
4.1 Determinação <i>in vitro</i> da atividade Sod mimética.....	31
4.2 Determinação <i>in vitro</i> da atividade Cat mimética	32
4.3 Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas e condições de cultivo.....	33

4.4 Compostos de coordenação, preparo das soluções e condições para o tratamento das células	34
4.5 Condições para exposição das células ao estresse oxidativo.....	35
4.6 Determinação do efeito dos compostos na sobrevivência das células <i>S. cerevisiae</i>	36
4.7 Determinação do efeito dos compostos na disfunção mitocondrial	36
4.8 Análise do envolvimento do fator de transcrição Yap1 na resposta ao estresse oxidativo	37
4.9 Avaliação da expressão da proteína de choque térmico Hsp104 após o tratamento com os compostos de coordenação.....	38
4.10 Determinação das atividades enzimáticas para Sod e Cat em <i>S. cerevisiae</i>	38
4.10.1 Obtenção do extrato livre de células	38
4.10.2 Dosagem da concentração de proteínas nos extratos livre de células	38
4.10.3 Determinação da atividade de superóxido dismutase.....	39
4.10.3.1 Gel de Resolução	39
4.10.3.2 Condições de eletroforese, revelação e quantificação de atividade.....	39
4.10.4 Análise da atividade de catalase	40
4.11 Determinação da captação dos compostos de coordenação pelas células de <i>S. cerevisiae</i>	41
4.12 Análises estatísticas	41
5. Resultados e Discussão.....	42
5.1 Determinação in vitro das atividades de superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat) dos compostos de coordenação.....	43
5.2 Determinação dos níveis de sobrevivência das células expostas ao estresse oxidativo após o tratamento com os compostos Sod miméticos	49
5.2.1 Avaliação do efeito protetor dos compostos de coordenação em uma cepa selvagem de <i>S. cerevisiae</i>	49
5.3 Avaliação do efeito protetor dos compostos de coordenação em uma cepa deficiente na enzima Cu/Zn Superóxido dismutase	54

5.4 Avaliação da capacidade dos compostos em reduzir a disfunção mitocondrial	58
5.5 Avaliação da indução da resposta celular após tratamentos com os compostos miméticos	60
5.5.1 Contribuição do fator de transcrição Yap1 para a resposta das células tratadas com os compostos miméticos.....	61
5.5.2 Indução da expressão e ativação da proteína Hsp104 após tratamento das células com os compostos miméticos	63
5.5.3 Avaliação da atividade endógena da Sod e Cat em células submetidas ao tratamento com os compostos miméticos.....	66
5.6 Determinação das concentrações intracelulares de metal.....	69
6. Conclusões.....	71
7. Referências	73

LISTA DE ABREVIACÕES

ATP – adenosina trifosfato

Cat – Catalase

CTA1 – Gene da catalase A;

CttA – Catalase A (peroxissomal)

CTT1 – Gene da catalase T

Ctt1 – Catalase T (citoplasmática)

CO₂ – Dióxido de carbono

Cu – Cobre

CuSO₄ - Sulfato de cobre

Cu/Zn-Sod1 - Cu/Zn-Superóxido dismutase

C1 - [Fe(HPCINOL)Cl₂]NO₃

C2 - [Fe₂(BPA)₂(μ-OCH₃)₂(Cl)₂]

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Fe - Ferro

GFP – *green fluorescent protein*

GLR1 – Gene da glutationa oxidoreductase

GSH – Glutationa reduzida;

GSH1 – Gene da tripeptídeo GSH

GSSG – Glutationa oxidada;

GPX – Gene da glutationa peroxidase

HO• - Radical hidroxila

H₂O - Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HSE - *Heat Shock Element*

HSF - *Heat Shock Factor*

HSPs – *Heat Shock Protein*

ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplada

MDA – malondialdeído

Mn - Manganês

Mn-Sod – Mn-Superóxido dismutase

NaOH – Hidróxido de sódio

NBT – Nitrotetrazólio (Nitro blue tetrazolium)

NO[•] - Óxido nítrico

O₂ – Oxigênio molecular

O₂^{•-} - Radical superóxido

ONOO⁻ - Peroxinitrito

ROO⁻ - Radicais peroxil

-SH – Tiol

STRE – *Stress Respose Elemente*

Sod – Superoxido dismutase

Sod1 – Cu/Zn-Superoxido dismutase

SOD1 – Gene da Cu/Zn-Superoxido dismutase

Sod2 – Mn-Superoxido dismutase

SOD2 – Gene da Mn-Superoxido dismutase

TEMED – Tetrametil etileno diamina

TRX – Gene da tiorredoxina

UQ₁₀ – Ubisemiquinona

YPD2% – Meio de cultura com extrato de lêvedo, peptona e glicose

YPGly4% – Meio de cultura com extrato de lêvedo, peptona e glicerol

Zn - Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da redução completa do O_2 a H_2O	4
Figura 2 – Reação de dismutação do radical $O_2^{\bullet -}$ catalisada pela enzima Sod1.	10
Figura 3 – Reação de dismutação do radical $O_2^{\bullet -}$ catalisada pela enzima Sod2	10
Figura 4 – Estruturas tridimensionais das isoformas da enzima superóxido dismutase e seus respectivos centros catalíticos.....	11
Figura 5 – Estrutura da catalase citoplasmática. A.	14
Figura 6 – Compostos de coordenação com atividade mimética.	17
Figura 7 – Representação esquemática da redução do NBT pelo radical superóxido....	31
Figura 8 – Estrutura química dos compostos de coordenação da série A.....	35
Figura 9 – Esquema das diluições seriadas na placa de <i>réplica plate</i>	37
Figura 10 – Curva de redução do NBT pelo sistema xantina/xantina oxidase, gerador de radical $O_2^{\bullet -}$	44
Figura 11 – Consumo de H_2O_2 na presença e ausência dos compostos tanto da série A quanto da série B (0,2 μM)	47
Figura 12 – Consumo de H_2O_2 na presença e ausência de compostos de coordenação...	48
Figura 13 – Efeito dos compostos miméticos a Sod na sobrevivência contra o estresse oxidativo.....	51
Figura 14 – Sobrevivência ao estresse oxidativo na cepa EG103 de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com diferentes concentrações dos compostos miméticos da série B.....	53
Figura 15 – Sobrevivência ao estresse oxidativo na mutante de <i>S. cerevisiae</i> <i>sod1Δ</i> tratadas com os compostos miméticos.	56
Figura 16 – Efeito do tratamento com os compostos na disfunção mitocondrial em células selvagens de <i>S. cerevisiae</i>	59
Figura 17 – Efeito dos compostos de coordenação em <i>S. cerevisiae</i> deficiente na expressão de Yap1	62
Figura 18 – Indução da expressão da Hsp104-GFP	65

Figura 19 – Ativação das enzimas Sod e Cat de <i>S. cerevisiae</i> após o tratamento com os compostos Sod miméticos	68
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho...	33
Tabela 2 – Porcentagem de inibição da redução do NBT obtido para os compostos de ferro...	45
Tabela 3 – Determinação da quantidade de metal ferro no interior de células de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com os compostos miméticos...	70

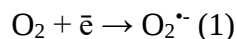
1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse Oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio

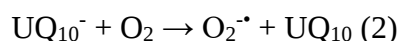
A produção de energia em organismos aeróbicos consiste basicamente na transferência de energia química acumulada nas ligações de compostos orgânicos de alto teor energético, havendo consumo de oxigênio (O_2) e liberação de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O). O O_2 é uma molécula oxidante utilizada por esses organismos como aceptor final de elétrons durante a última etapa da cadeia transportadora de elétrons. O processo de transferência de energia ocorre em três grandes etapas: glicólise, ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória. Várias enzimas e cofatores estão envolvidos nessas etapas. As mitocôndrias geram a maior parte do ATP necessário para as células aeróbicas, através de um conjunto de reações que se iniciam no ciclo do ácido cítrico, que ocorre na matriz mitocondrial, e terminam com a transferência de elétrons e fosforilação oxidativa, que ocorrem na membrana mitocondrial interna (Stryer, L., 2010).

Na fosforilação oxidativa, a síntese de ATP está acoplada ao fluxo de elétrons do NADH para o O_2 gerando um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. O fluxo de elétrons do NADH até o O_2 passa por três grandes complexos transmembranares, *NADH: Q redutase* (complexo I), *Q: citocromo oxidoreductase* (complexo III) e *citocromo c oxidase* (complexo IV), todos localizados na membrana mitocondrial interna. Este fluxo de elétrons resulta em um bombeamento de prótons para fora da matriz mitocondrial e na geração de um potencial de membrana que impulsionará a produção de ATP através da F_0/F_1 ATP sintase. Um quarto grande complexo proteico, denominado *succinato: Q redutase* contém a succinato desidrogenase que gera $FADH_2$ no ciclo do ácido cítrico. Os elétrons deste $FADH_2$ entram na cadeia transportadora de elétrons no complexo II e fluem até a molécula de O_2 através dos complexos III e IV (Stryer, L., 2010).

A cadeia transportadora de elétrons desempenha um papel central na produção de energia em organismos aeróbicos e consome mais de 95% do oxigênio captado pelos mesmos, sendo totalmente reduzido com a formação de H_2O ao fim do processo (Ruckenstuhl, Carmona-Gutierrez & Madeo, 2010). A redução do O_2 à H_2O é resultado da transferência sequencial de quatro elétrons para o O_2 . Cabe a atividade catalisada pela enzima *citocromo c oxidase* (complexo IV) reduzir o O_2 totalmente a H_2O sem que ocorra a liberação do O_2 parcialmente reduzido, tal como é apresentado na equação (1) (Halliwell, 2006; Ye *et al.*, 2009).



Em condições normais, a produção do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pela cadeia respiratória é estimada em taxas inferiores a 5% do total da taxa de transporte de elétrons do NADH para o oxigênio, isso ocorre especialmente nos complexos I e III da cadeia respiratória, onde há a participação da ubisemiquinona (UQ_{10}). A UQ_{10} , uma espécie gerada durante as reações de transporte de elétrons na cadeia respiratória, é capaz de doar elétrons para o oxigênio, o que a torna uma fonte constante de $\text{O}_2^{\bullet-}$. A equação (2) mostra a formação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ através da ubisemiquinona. Cabe ressaltar que os níveis do $\text{O}_2^{\bullet-}$ podem aumentar em condições que aumentem a demanda por O_2 , como por exemplo durante exercícios físicos e processos patológicos (Willkox, *et al.*, 2004; Labuschagne & Brenkman, 2013; Che, *et al* 2015).



Com relação as características do $\text{O}_2^{\bullet-}$, esse radical é pouco estável e a sua maior parte é reduzida à H_2O_2 e O_2 pela enzima superóxido dismutase (Sod) (Vasconcelos, *et al.*, 2007; Maurya, *et al.*, 2016). No entanto, sabe-se que este radical pode ser decomposto espontaneamente, no entanto com uma estequiometria diferente de quando é dismutado pela enzima Sod (Rona, *et al.*, 2015). Quanto a fração remanescente, esta pode ser combinada ao óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$), uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) levando a formação de peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\bullet-}$), um potente oxidante biológico (Koppenol, *et al.*, 1992). Em condições fisiológicas, o $\text{NO}^{\bullet}$ é formado a partir do aminoácido L-arginina através da reação catalisada pela enzima NO sintase. Este radical, apesar de ser um radical pouco reativo é essencial para diversos processos biológicos, tais como a vasoregulação e neurotransmissão (Dusse, L. M. S., Vieira, L. M. & Carvalho, M. G, 2003). Por outro lado, quando em excesso, pode inibir a *citocromo c oxidase*, levando ao aumento do vazamento de elétrons e consequente formação de mais $\text{O}_2^{\bullet-}$ e, consequentemente mais $\text{ONOO}^{\bullet-}$.

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode ainda inativar proteínas que contêm *clusters* de Fe-S, tais como as enzimas *aconitase*, *succinato desidrogenase* e *NADH-ubiquinona oxidoreductase* (Raha, S. & Robinson, B. H., 2000; Rahat, *et al.*, 2011). Isoladamente, esse radical é pouco reativo e, portanto, não é altamente citotóxico. Porém, os efeitos deletérios provêm da

habilidade deste em gerar radicais secundários, extremamente tóxicos, tais como o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) e o ONOO^- .

Portanto, apesar de ser essencial para a obtenção de energia durante a respiração celular, o O_2 pode ser parcialmente reduzido gerando as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), tais como os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), bem como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 1). Cabe ressaltar que algumas dessas espécies são extremamente instáveis, enquanto que outras são capazes de se difundir através do meio intracelular possuindo meia-vida relativamente longa (Augusto, 2006; Niccoli e Partridge, 2012; Ristow e Schmeisser, 2011).

Sabe-se, portanto, que as EROs podem ser geradas pelo metabolismo celular ou em resposta a estresses ambientais, tais como pela exposição à radiação ultravioleta, ozônio, xenobióticos, alergênicos, cigarros, produtos químicos, e até mesmo micro-organismos patogênicos. (Sá, *et al.*, 2013; Dasgupta & Klein, 2014; Ribeiro, *et al.*, 2015).

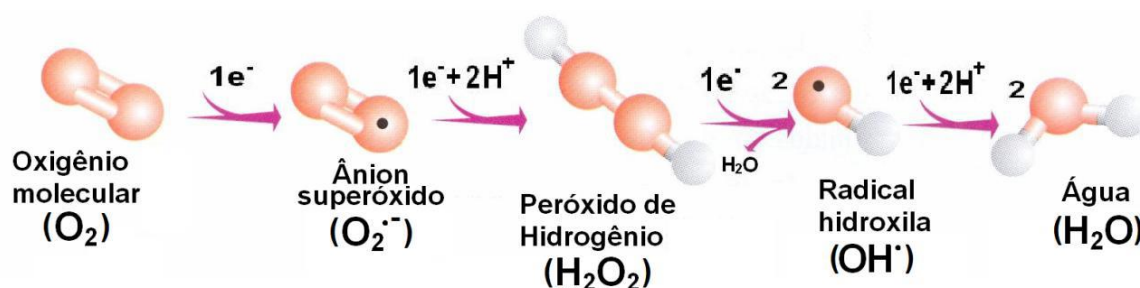
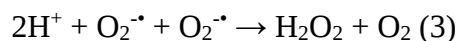
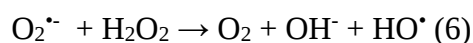


Figura 1. Etapas da redução completa do O_2 a H_2O . Este fenômeno ocorre no interior das mitocôndrias durante o metabolismo respiratório. É possível observar a redução completa do oxigênio molecular à água, e a formação das EROs quando esta redução é parcial (adaptado de Augusto, 2006).

O H_2O_2 , formado principalmente pela dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (3), tem a capacidade de permear membranas e difundir-se para dentro e fora da célula. Apesar de não ser um radical, é um fraco agente oxidante, reage lentamente com proteínas do tipo heme e peroxidases, porém é capaz de iniciar reações radiculares, tal como a peroxidação lipídica (Costa *et al.*, 2007; Vasconcelos, *et al.*, 2007). Além disso, pode participar da reação que produz o radical $\text{HO}^\bullet$. Este radical é formado pela reação entre o H_2O_2 com íons metálicos, tais como Fe^{2+} (4) e Cu^{2+} (5) através da reação de Fenton (Battin & Brumaghim, 2008; Maurya, *et al.*, 2016).



O radical $\text{HO}^{\cdot}$ é o mais reativo dentre todas as EROs conhecidas, com uma estimativa de meia-vida fisiológica da ordem de 10^{-9} segundos. Ele é extremamente tóxico e mutagênico para o qual o organismo humano não dispõe de mecanismos de eliminação. Essa ERO danifica a membrana celular, promovendo a peroxidação lipídica, causa danos à estrutura do DNA promovendo modificações das bases e quebra das fitas, e às proteínas e enzimas. O $\text{HO}^{\cdot}$ também pode ser formado pela reação do H_2O_2 com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ (6), uma reação desencadeada pela Reação de Haber – Weiss (Kehrer, J. P., 2000).



Embora as EROs desempenham papéis importantes em processos biológicos, como resposta imune, sinalização celular, apoptose, expressão gênica, regulação dos transportadores e canais de íons, fagocitose, regulação do crescimento celular, entre outras funções, esses oxidantes também podem exercer efeitos deletérios em todos os componentes celulares (Alves, *et al.*, 2010; Lü, *et al.*, 2010; Macedo-Márquez, 2012; Ribeiro, *et al.*, 2015). Há situações em que o aumento da formação dessas espécies reativas está diretamente associada, seja como causa ou consequência com diversas condições, tais como em inflamações crônicas, na absorção e ingestão de produtos químicos, administração medicamentosa de altas concentrações de oxigênio ou durante períodos de reperfusão de tecidos após isquemia (Raha, S. & Robinson, B. H., 2000).

Nestes casos a formação dessas espécies reativas excede a capacidade do sistema antioxidante e de reparo do organismo, causando o estresse oxidativo que leva a danos oxidativos às biomoléculas. Portanto, o estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre a homeostase redox celular devido à ineficiência do sistema antioxidante em eliminar a excessiva produção de EROs (Morano, K. A., Grant, C. M & Moye-Rowley, W. S., 2012). Cabe ressaltar que os danos causados pelas EROs podem levar à morte celular, acelerando diversos processos fisiológicos, tal como o envelhecimento, bem como induzir a gênese de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Abbott *et al.*, 2009; Moskovitz *et al.*, 2001). Neste cenário, estudos indicam que condições fisiopatológicas e doenças graves, incluindo lesão isquêmica/reperfusão

cardíaca, processos inflamatórios, doenças neurodegenerativas, bem como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, aterosclerose, câncer ou diabetes mellitus têm sido associados com o aumento de EROs e consequentemente ao estresse oxidativo (Valko *et al.*, 2007).

1.1.1 Danos às biomoléculas provocados por EROs

Os avanços na compreensão dos mecanismos de danos oxidativos em biomoléculas permitiram identificar uma diversidade de biomarcadores, tais como carbonilação de proteínas, oxidação de lipídios e oxidação das bases nitrogenadas do DNA. Ao longo dos anos, esses biomarcadores têm sido empregados para associar a ocorrência do estresse oxidativo com diversos processos patológicos (Costa, *et al.*, 2007).

As EROs são as maiores responsáveis pelos danos que afetam as estruturas celulares, provocando prejuízos na resposta celular e consequentemente uma redução da longevidade celular em diversos organismos. Os danos induzidos pelas EROs causam: (a) fragmentação da estrutura proteica; (b) modificações nas cadeias de aminoácidos; (c) encurtamento de ácidos graxos em lipídios; (d) oxidação de carboidratos; (e) oxidação de bases nitrogenadas; (f) sítios abásicos no DNA; (g) quebra de fita simples e dupla do DNA entre outros danos (Costa, *et al.*, 2007; Morano, K. A., Grant, C. M & Moye-Rowley, W. S., 2012).

O radical $\text{HO}^\bullet$, por exemplo, é conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA (tanto nuclear quanto mitocondrial), danificando principalmente as bases púricas e pirimídicas, mas também a estrutura de desoxirribose. A eletrofilicidade do radical $\text{HO}^\bullet$ possibilita sua interação com as bases nitrogenadas por adição às insaturações, especialmente em sítios de alta densidade eletrônica (Yu, *et al.*, 2012). Assim, a $\text{HO}^\bullet$ reage com as bases púricas nos carbonos das posições 4, 5 e 8. Já o ataque às bases pirimídicas acontece por adição à ligação dupla, afetando os carbonos nas posições 5 e 6 (Jomova & Valko, 2011; Yu, *et al.*, 2012). Além dos danos às bases nitrogenadas, os danos a desoxirribose ocorrem através da abstração de um dos átomos de hidrogênio, prejudicando o arcabouço que sustenta a molécula de DNA, promovendo sua ruptura (Labuschagne & Brenkman, 2013; Dias *et al.*, 2014). O DNA mitocondrial possui uma taxa de mutagênese maior do que a do DNA nuclear, por conta de diversos fatores, tais como a ausência do sistema de reparo por excisão de nucleotídeo (NER – Nucleotide Excision Repair), das proteínas histonas e da proximidade com o genoma mitocondrial à membrana mitocondrial interna, sítio onde são geradas as EROs. As

modificações permanentes causadas pelos danos oxidativos ao material genético representam o primeiro passo para a mutagênese, carcinogênese e consequentemente a gênese de diversas doenças (Cha, M., Kim, D. K. & Mook-Jung, I., 2015; Valko *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos, componentes de fosfolipídios da membrana celular também são muito sensíveis à oxidação, em especial os de cadeia poliinsaturada presentes na membrana das células e das organelas de seres eucarióticos (Herdeiro, *et al.*, 2006). Uma vez formados, os radicais peroxil ($\text{ROO}^{\bullet}$) podem sofrer um rearranjo e formar endoperóxidos, cujo produto final da reação de peroxidação é a formação de aldeídos, como malondialdeído (MDA). O MDA é um produto mutagênico para bactérias e células de mamíferos, além de ser carcinogênico em ratos (Valko *et al.*, 2007). Uma característica particular da peroxidação lipídica é a ocorrência de reações em cadeia. Desta forma, quando não são interrompidas pelo sistema antioxidante, ocorrem continuamente, gerando danos a outras moléculas lipídicas vizinhas. Além disso, a peroxidação lipídica acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares o que leva a perda da seletividade e permeabilidade da membrana (Daum, *et al.*, 2007).

Além dos ácidos graxos, as proteínas também podem ser oxidadas por todas as EROs, assim como pelos produtos gerados na oxidação dos lipídios em decorrência do estresse oxidativo. Esses oxidantes, em geral, produzem modificações em proteínas, que levam à perda de função e aumentam a taxa de degradação das mesmas (Gomes, *et al.*, 2008; Vigneswara, *et al.*, 2013). Particularmente, o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode atacar especificamente os grupamentos [4Fe-4S] de proteínas, como o da enzima aconitase. Este ataque promove a liberação de Fe^{2+} , que pode participar de reações com o H_2O_2 gerando o $\text{HO}^{\bullet}$ através da reação de Fenton. O radical $\text{HO}^{\bullet}$ por sua vez, aumenta ainda mais a condição oxidativa dentro da célula, contribuindo para a continuidade do processo de oxidação dos aminoácidos, alterando ou inativando a função das proteínas (Valko *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2007). As EROs podem ainda causar modificações específicas, tais como a oxidação da cisteína e metionina, bem como a formação de grupos carbonilas, frequente em proteínas ricas em resíduos de prolina, arginina, lisina, treonina, histidina (Mariani, 2008). Cabe ressaltar que este último dano é irreversível e irreparável, devendo-se ativar mecanismos de eliminação das proteínas oxidadas. Entretanto, quando o nível de proteína carbonilada é alto, elas podem se acumular na célula em agregados, interferindo na função do proteossoma (Thanan *et al.*, 2014).

Em conjunto, os dados apresentados anteriormente, demonstram os efeitos nocivos do estresse oxidativo, além das diversas possibilidades de danos que podem ser provocados pelas EROs.

1.2 Sistemas Antioxidante

Para eliminar as EROs, as células eucarióticas dispõem de um complexo sistema antioxidante (enzimático e não-enzimático). O sistema enzimático antioxidante é representado por um grupo de enzimas com diferentes funções, dentre as quais podem ser citadas: glutathione peroxidase, glutathione-reductase, catalase, superóxido dismutase e a metionina sulfóxido reductase, que estão envolvidas na degradação das EROs e reparo das biomoléculas danificadas por tais oxidantes (Wang, J., *et al.*, 2006; Calabrese, *et al.*, 2007; Jomova & Valko, 2011). Dentre as enzimas deste sistema, podemos destacar a superóxido dismutase (Sod), bem como a catalase (Cat), responsáveis por executar papéis de extrema importância para o equilíbrio redox e para a preservação das estruturas celulares, que são capazes de catalisar reações de degradação do $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 , respectivamente. Dessa forma, Sod e Cat tem como função reduzir os níveis dessas EROs assim que são formadas, mantendo a concentração dessas moléculas em níveis basais (Adachi, *et al.*, 2009). Cabe ressaltar que o equilíbrio entre a atividade dessas enzimas é fundamental, uma vez que a atividade da Sod gera moléculas de H_2O_2 , que, posteriormente, precisam ser degradadas pela catalase (Day, 2009).

Além do sistema enzimático, as células eucarióticas possuem ainda uma diversidade de moléculas não-enzimáticas que atuam na proteção contra o estresse oxidativo, e ainda no reparo dos danos causados por esta forma de estresse. Estas moléculas encontram-se distribuídas por toda a célula, a fim de proteger todas as suas estruturas contra a ação deletéria das EROs. Dentre os componentes do sistema não-enzimático, pode-se destacar a glutathione (GSH), vitamina C, vitamina E, vitamina A, e os flavonóides (Valko, *et al.*, 2005; Singh, Devaraj & Jialal, 2005; Jomova & Valko, 2011). A GSH, um tripeptídeo formado pelos resíduos ácido glutâmico, cisteína e glicina (Semchyshyn *et al.*, 2011), é um dos antioxidantes mais distribuído nas células, podendo ser encontrados em altas concentrações no meio intracelular. Sua ação protetora baseia-se na oxidação do grupamento tiol ($-SH$) de sua cisteína, com a consequente formação de glutathione oxidada (GSSG). A GSH tem destaque dentre todos os componentes do sistema primário não-enzimático, pois participa não somente do sistema antioxidante,

mas também de inúmeros processos intracelulares, tais como o transporte de aminoácidos, a síntese de proteínas e ácidos nucleicos e mecanismos de proteção contra carcinógenos (Gomes, *et al.*, 2008; Jomova & Valko, 2011).

1.2.1 Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1.)

A produção de $O_2^{\cdot -}$ é contrabalançada por um sistema antioxidante primário e rápido, uma vez que o $O_2^{\cdot -}$ é uma molécula que pode levar a formação de outras radicais livres de toxicidade elevada. Tal sistema se deve a presença de enzimas, tais como as superóxido dismutases (Sods). Essas enzimas podem ser encontradas em todos os organismos eucarióticos, e também em bactérias (Scott, Meshnick & Eaton, 1987). Uma característica marcante dessas enzimas é a presença de diversos metais, tais como o ferro (Fe^{3+}), manganês (Mn^{2+}), cobre (Cu^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) em seu sítio ativo (Barondeau, *et al.*, 2004).

A Cu/Zn-Superóxido dismutase (Cu/Zn-Sod ou Sod1) é uma isoforma encontrada no citoplasma, núcleo, peroxissoma e no espaço intermembranar da mitocôndria de células eucarióticas, no periplasma de bactérias gram-negativas, e em plastídeos de plantas (Barondeau, *et al.*, 2004). Esta isoforma é um homodímero e possui um átomo de cobre e um de zinco no sítio ativo de cada subunidade (Sanjay, *et al.*, 2011; Valentine, J. S., Doucette, P. A., & Zittin Potter, S. 2005). No centro catalítico está o cobre, onde a Sod1 catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ em O_2 e H_2O_2 (Reação 1, Figura 2). Embora o íon de zinco não atue na catálise, ele é importante para estabilizar a estrutura da enzima (Cerqueira, 2007). Essa catálise ocorre em um processo de duas etapas, na qual na primeira etapa, uma molécula de $O_2^{\cdot -}$ reduz o íon cúprico para formar o O_2 (Reação 2, Figura 2) e, na segunda etapa, a segunda molécula de $O_2^{\cdot -}$ reoxida o íon cuproso para formar o H_2O_2 (Reação 3, Figura 2) regenerando o íon cúprico do sítio ativo da Sod1. A Sod1 é muito eficiente na catálise destas reações (Valentine, J. S., Doucette, P. A., & Zittin Potter, S. 2005).

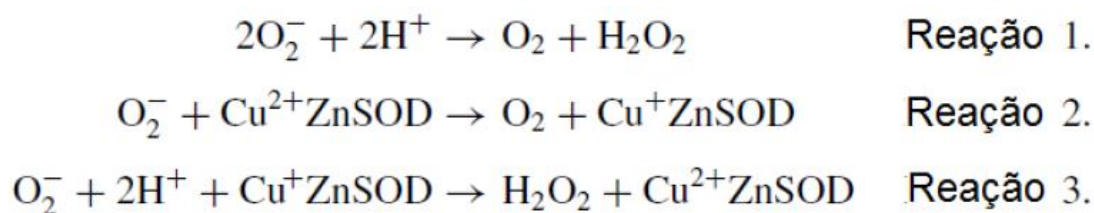


Figura 2: Reação de dismutação do radical O_2^- catalisada pela enzima Sod1 (Adaptada de Valentine, J. S., Doucette, P. A., & Zittin Potter, S. 2005).

Uma segunda isoforma da Sod, a Mn-Superóxido dismutase (Mn-Sod ou Sod2), é encontrada nas mitocôndrias de todas as células de mamíferos e também em *E. coli*, sendo responsável pela dismutação do O_2^- produzido no interior dessa organela. A Sod está organizada na forma de um tetrâmero que apresenta em seu sítio ativo um cátion manganês por subunidade (Jomova & Valko, 2011; Xiang, *et al.*, 2011). Apesar das diferenças estruturais, ambas as isoformas da Sod catalisam a mesma reação (Miriayala, *et al.*, 2012). A dismutação do O_2^- pela Sod2 ocorre através de um mecanismo cíclico entre o manganês oxidado (Mn^{3+}) e reduzido (Mn^{2+}) (Figura 3).

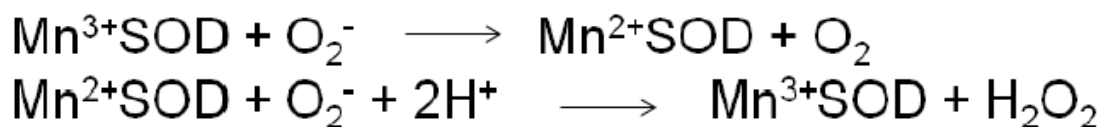


Figura 3: Reação de dismutação do radical O_2^- catalisada pela enzima Sod2 (adaptada de Sheng, *et al.*, 2011).

Em organismos procariotos anaeróbicos é frequente a presença da Fe-Sod. Enquanto que todos os organismos aeróbicos obrigatórios possuem a Mn-Sod, os anaeróbicos facultativos contêm ambas as isoformas da Sod, a Mn-Sod e Fe-Sod (O'Brien *et al.*, 2004). A Sod3 foi a última isoforma a ser descoberta, e semelhantemente a Sod1 também possui em seu sítio ativo os metais Cu e Zn (Navarro-Yepes, *et al.*, 2014). Atualmente, diversos estudos têm buscado desvendar a regulação biológica, bem como a função desta isoforma extracelular. Essa isoforma tetramérica e glicosilada é encontrada no espaço extracelular de células de mamíferos. Acredita-se que a necessidade de proteção celular contra fontes exógenas de O_2^- pode explicar a existência desta terceira isoforma. Cabe ressaltar que o O_2^- tem como característica não ser permeável a membranas biológicas, havendo assim a necessidade da presença de diferentes isoformas

Sods em locais distintos para remoção deste radical (Jomova & Valko, 2011; Miller, 2004).

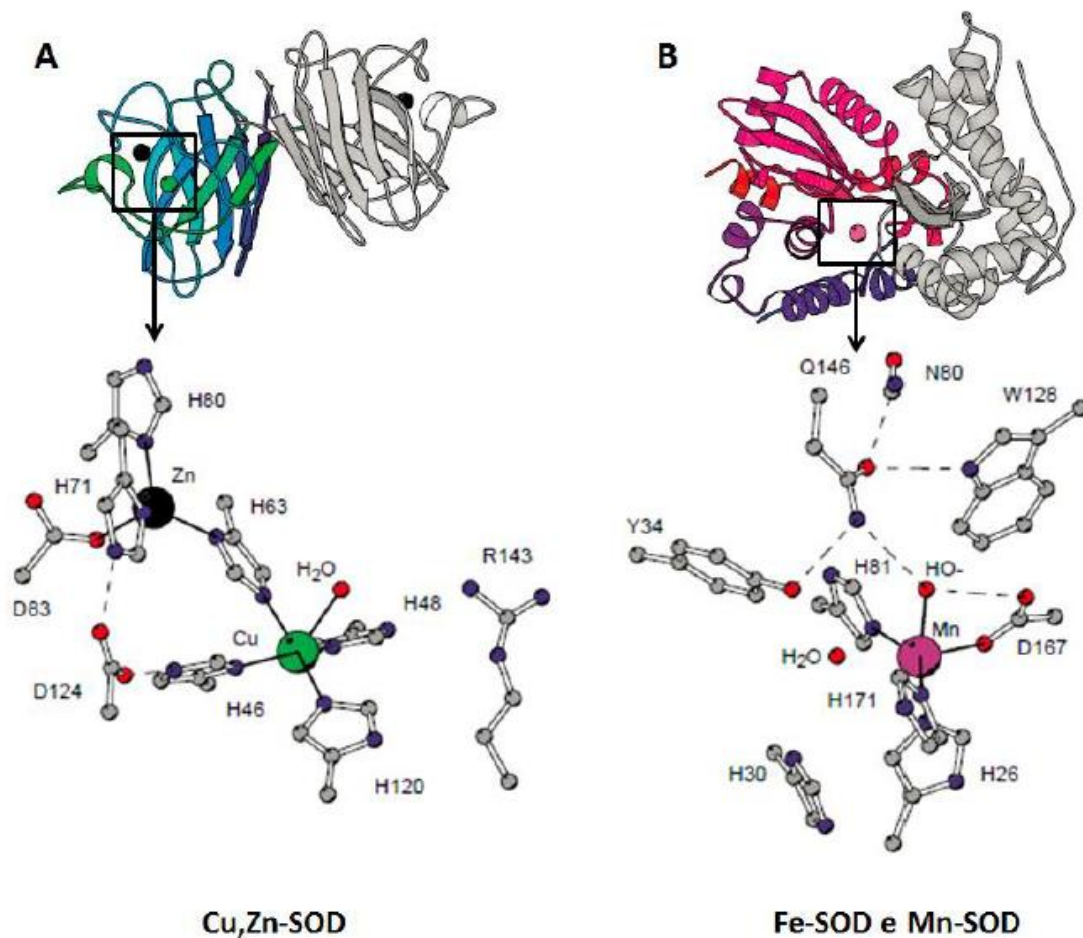


Figura 4. Estruturas tridimensionais das isoformas da enzima superóxido dismutase e seus respectivos centros catalíticos. Comparação das formas enoveladas das Sod1 (Cu/Zn-Sod) e Sod2 (Mn-Sod ou Fe-Sod). **A.** Cu/Zn-Sod é um homodímero com subunidades contendo 154 aminoácidos cada. Os íons cobre e zinco aparecem destacados em verde e preto, respectivamente. **B.** Mn-Sod ou Fe-Sod possuem monômeros com aproximadamente 200 aminoácidos, e podem ser encontradas como dímeros ou tetrâmeros. O íon metálico (que pode ser Mn ou Fe) aparece destacado em rosa (Ribeiro, T. P., 2016).

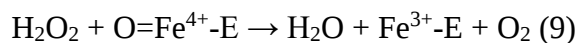
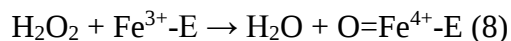
1.2.2 Catalase (EC 1.11.1.6)

A catalase, responsável por degradar o H_2O_2 que se encontra em altas concentrações no interior das células, foi a primeira enzima antioxidante a ser descoberta e caracterizada em todos os organismos aeróbicos (Zamocky, M., *et al.*, 2008). A catalase, por sua alta conservação evolucionária e sua capacidade em catalisar eficientemente a decomposição do H_2O_2 a H_2O e O_2 , tem sido apontada como uma das principais enzimas que, durante o processo evolucionário, permitiu que os organismos pudessem sobreviver em ambientes aeróbios, possibilitando a utilização do oxigênio em seu metabolismo (Herrero *et al.*, 2008; Limoli *et al.*, 2006). As catalases são enzimas de grande importância para o sistema de proteção celular reduzindo o nível de oxidação do meio intracelular e consequentemente mantendo a sobrevivência das células em condições de estresse.

Devido seu potencial oxidativo, o H_2O_2 , gerado na dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela Sod, ou pela cadeia transportadora de elétrons, pode representar ainda perigo às biomoléculas. A catalase é uma hemoproteína que possui quatro grupos heme, um em cada sub-unidade do tetrâmero. A alta especificidade para o H_2O_2 , faz da catalase a enzima com o maior poder catalítico dentre todas as enzimas conhecidas (Reação 7) (Valko *et al.*, 2006).



A Catalase executa, de maneira extremamente rápida, a decomposição de moléculas de H_2O_2 em duas etapas como visto nas equações (8) e (9). Primeiramente, o H_2O_2 se liga ao átomo de Fe^{3+} do grupo heme presente na Fe-Cat, que está cercado pelos resíduos histidina e asparagina, criando um ambiente hidrofóbico, facilitando o trânsito de H_2O_2 para o seu interior (Jomova & Valko, 2011). Esta molécula é então degradada, tendo um dos átomos de oxigênio extraído, ligando-se ao átomo de ferro presente no centro ativo. Em seguida a ligação O-O do peróxido de hidrogênio é clivada, uma molécula de água é formada e um átomo de oxigênio continua ligado ao átomo de ferro, formando assim um radical $\text{O}=\text{Fe}^{4+}$. Esta espécie reage então com uma segunda molécula de H_2O_2 formando água e oxigênio molecular e o centro metálico de ferro é reduzido, retornando ao seu estado de oxidação +3, como mostrado a seguir (Costa *et al.*, 2007; Rauen *et al.*, 2004; Jaeschke, 2010).



Em organismos eucarióticos, é possível observar a presença de duas isoformas dessa importante enzima antioxidante. Ambas apresentam características estruturais semelhantes, porém encontram-se localizadas em compartimentos celulares diferentes. A catalase A (CttA), localizada no interior dos peroxissomas, é uma enzima codificada pelo gene *CTA1*. Já a catalase T (Ctt1) localiza-se no citoplasma das células e é codificada pelo gene *CTT1* (Rauen *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2015). A presença de uma catalase peroxissomal é de extrema relevância, pois o peroxissomo é uma organela celular no qual ocorre a atuação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e também na β -oxidação de ácidos graxos, processos capazes de gerar uma grande quantidade de H_2O_2 (Perfeito, *et al.*, 2013; Valko, *et al.*, 2005). Sabe-se também que a isoforma peroxissomal também é encontrada no interior das mitocôndrias, o que reforça a grande relevância dessa enzima para o controle da geração das EROs (Rauen, *et al.*, 2004; Braga, *et al.*, 2017). Já a isoforma citosólica, Ctt1, desempenha um papel importante na eliminação do H_2O_2 , produzido no metabolismo respiratório ou proveniente do meio extracelular. Devido à capacidade do H_2O_2 em difundir-se através das membranas, a presença da catalase citoplasmática garante que as moléculas que atravessarem a membrana mitocondrial ou celular sejam degradadas no citoplasma, evitando as lesões oxidativas às biomoléculas (Horn *et al.*, 2010; Miriyala *et al.*, 2012).

Desta forma, essas duas isoformas desempenham um papel importante na manutenção do equilíbrio redox. As catalases são capazes de decompor o H_2O_2 , não só reduzindo os níveis dessa ERO, como evitando a oxidação direta de biomoléculas, além de impedir a formação do radical $\text{HO}^\bullet$ através das reações de Fenton e Haber-Weiss (Jomova & Valko, 2011; Miriyala, *et al.*, 2012).

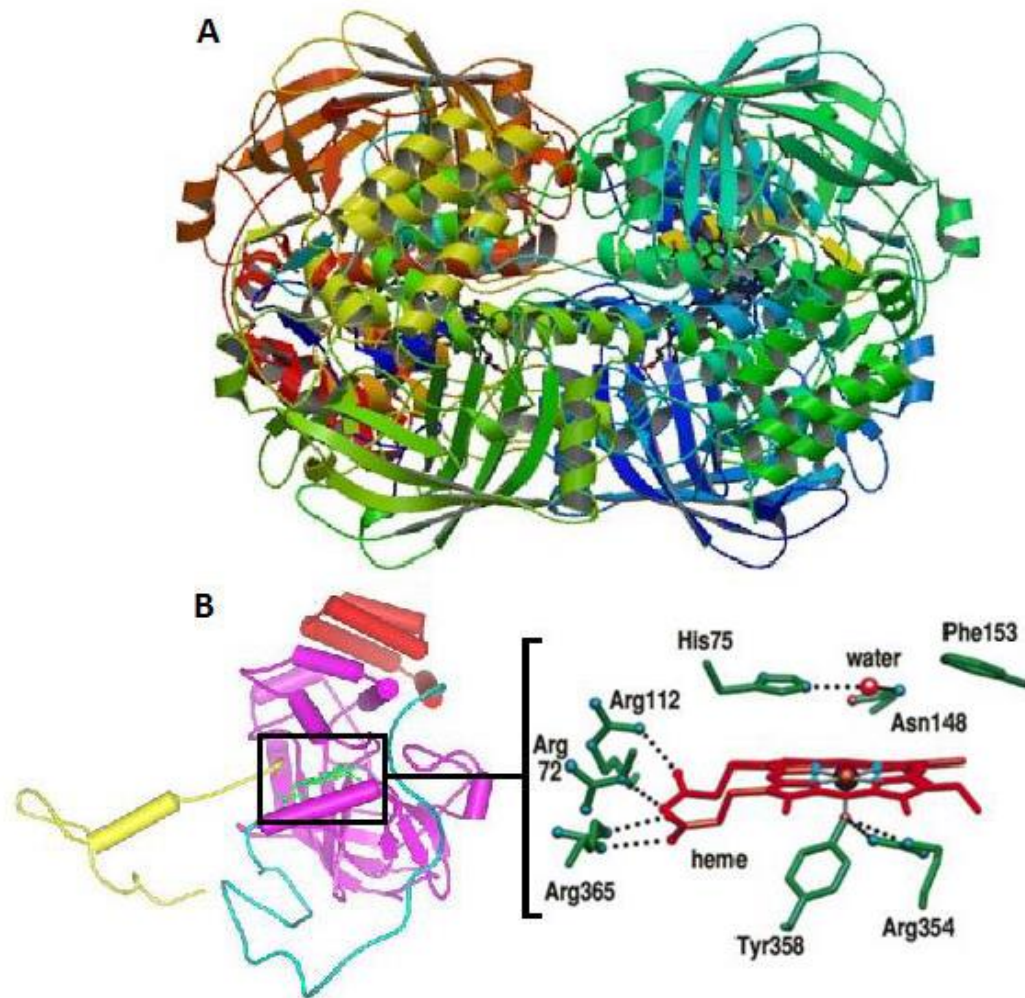


Figura 5. Estrutura da catalase citoplasmática. **A.** Estrutura tridimensional da enzima catalase citoplasmática humana tetramérica, mostrando também a estrutura secundária adotada pela interação entre os aminoácidos que se encontram próximos uns aos outros na cadeia peptídica. **B.** Estrutura do sítio ativo da enzima, representando o grupo heme (vermelho) e os resíduos que participam da catálise (Ribeiro, T. P., 2016).

1.3 Compostos de coordenação: uma alternativa para a redução do estresse oxidativo

1.3.1 Princípios Básicos da Química Bioinorgânica

A química bioinorgânica propiciou o desenvolvimento de uma área multidisciplinar, envolvendo diversas outras áreas do conhecimento, tais como a bioquímica e a farmacologia. Seus objetivos concentram-se na busca por compostos de baixo peso molecular que sejam capazes de modelar características estruturais e/ou funcionais de inúmeros sistemas biológicos, tais como proteínas e enzimas que contenham metais em sua estrutura (González-Álvarez, *et al.*, 2005, Sustmann, *et al.*, 2007). Um dos desafios da química bioinorgânica moderna é compreender o modo de ação dos metais nos sistemas vivos e suas interações moleculares, tendo como finalidade a aplicação destes conhecimentos na medicina, biologia, ciências ambientais e em processos biotecnológicos (Margiotta, *et al.*, 2014).

Neste contexto, a química bioinorgânica que visa o desenvolvimento de modelos sintéticos funcionais para metaloproteínas tem contribuído significativamente para a compreensão do modo de ação dessas moléculas. A vantagem da utilização de modelos sintéticos no estudo das metaloproteínas é devido à facilidade de obtenção e caracterização dos compostos sintéticos quando comparados à enzima natural. Sendo assim, a primeira etapa para o desenvolvimento de um produto através da química bioinorgânica, que tem como propósito mimetizar uma determinada proteína/enzima, deve ser a seleção do sistema a ser mimetizado.

Em geral, os compostos de coordenação contêm um ou mais átomos ou íons centrais, aos quais estão ligadas moléculas neutras ou carregadas. Nesses compostos, o átomo central é, geralmente, um metal de transição, capaz de formar ligações coordenadas com seus ligantes (Farias, *et al.*, 2009). Sugere-se que as propriedades redox atribuídas aos íons metálicos presentes nos compostos de coordenação, que por ventura possam apresentar potenciais aplicações médicas, poderiam atuar de forma complementar às atividades já exibidas por outros compostos orgânicos, que são usualmente utilizados como fármacos (Sun, *et al.*, 2007).

As interessantes propriedades medicinais (antioxidante, antitumoral, antimalária, antitripanossomíase, antitoxoplasmose, antileishmaniose) destes compostos têm motivado a síntese e caracterização de novos compostos, bem como subsequentes

investigações de suas propriedades farmacológicas em sistemas biológicos. Esse interesse pode ser percebido pelo crescente número de artigos publicados nessa área (Fernandes, *et al.*, 2010, López-Torres, *et al.*, 2011; Juribašić, *et al.*, 2011, Almeida, *et al.*, 2013; Fernandes, *et al.* 2014; Tan, *et al.*, 2014; Fernandes, *et al.*, 2015; Ribeiro, *et al.*, 2015; El-Wakiel, *et al.* 2015, Devereux, *et al.*, 2016).

1.3.2 A relevância dos compostos de coordenação como alternativa terapêutica contra o estresse oxidativo

As metaloenzimas da classe das oxirredutases (catalases, superóxido dismutases e glutathione peroxidases) são especializadas na degradação de H_2O_2 e radical $O_2^{\cdot-}$ (Matés, J. M. *et al.*, 1999; Janssen, A. M. *et al.*, 1998). Sabe-se que o estresse oxidativo causado por diversas patologias pode estar relacionado com o aumento de lesões oxidativas causadas pelas EROs (Brunk, U. T. & Terman, A., 2002).

A obtenção de compostos sintéticos e miméticos às enzimas catalase e superóxido dismutase tem se mostrado de grande relevância tendo em vista que tais moléculas seriam empregadas para o desenvolvimento de novos medicamentos antioxidantes que contribuam para a redução dos danos causados pelas EROs. Cabe ressaltar o crescimento, no setor farmacêutico, do número de depósitos de patentes de metalofármacos baseados em compostos de coordenação com atividade antioxidante (Malfroy-Camine, B. & Doctrow, S. R. 1998; Kubota, S. 2002).

Compostos de coordenação têm sido amplamente estudados quanto a atividade antioxidante, a fim de mimetizar as metaloenzimas Sod e Cat. Isto se deve ao fato da grande versatilidade dos ligantes e da possibilidade de se obter, em alguns compostos, estruturas muito similares às exibidas pelas referidas metaloenzimas. Ao longo da última década, diversos compostos contendo diferentes metais e ligantes, tem se mostrado bons modelos sintéticos para essas enzimas antioxidantes. Muitos trabalhos têm sido publicados, relatando a atividade antioxidante de compostos de coordenação de cobre, ferro, cobalto, zinco, níquel, manganês, entre outros (Barnham & Bush, 2014; Day, 2009; Hambley, 2007b; Liu *et al.*, 2007; Rauen *et al.*, 2004).

Diversos compostos miméticos com capacidade de decompor as EROs geradas durante o estresse oxidativo já foram relatados. Dentre esses compostos, os sistemas miméticos do grupo Salen, compostos cíclicos não aromáticos (macrocíclicos) e as porfirinas (Figura 6) foram os que mais se destacaram até o momento, atingindo a fase de testes clínicos em seres humanos. (Munroe, *et al.*, 2007; Liu, *et al.*, 2007; Sustmann, *et*

al., 2007; Bukhari, *et al.*, 2008; Lessa, *et al.*, 2009; Starha, *et al.*, 2009; Anitha, *et al.*, 2013; Weitner, *et al.*, 2013; Ravichandran, *et al.*, 2014a; Ravichandran, *et al.*, 2014b; Selvaganapathy, *et al.*, 2014; Vivekanand, *et al.*, 2015).

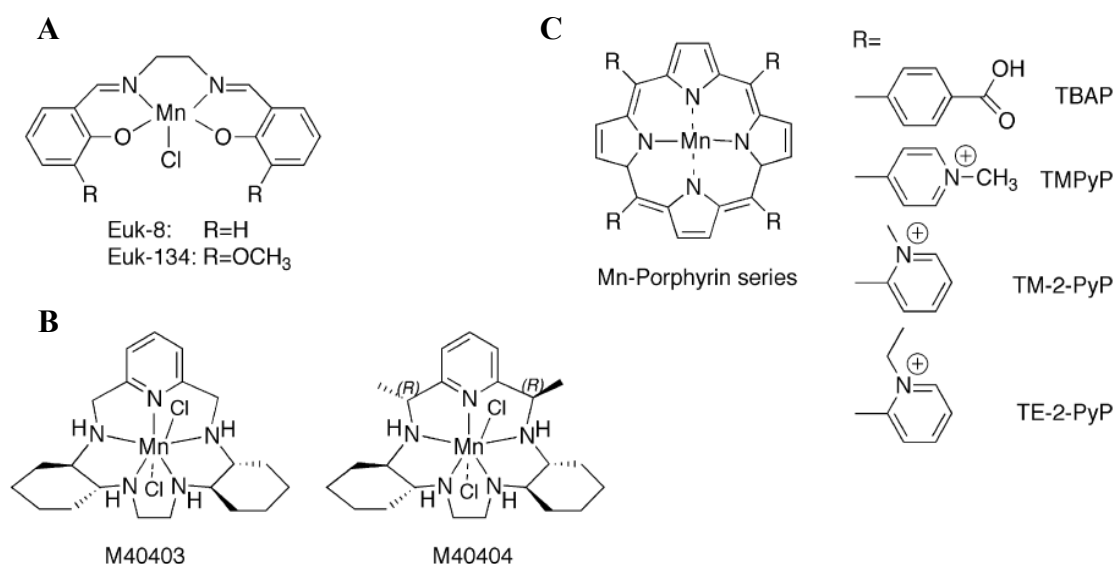


Figura 6. Compostos de coordenação com atividade mimética. Diferentes compostos com atividade mimética antioxidante que foram sintetizados. **(A)** Compostos Eukarion (Cayman Chemical, Michigan, EUA), são um conjunto de compostos sintéticos manganês-saleno. **(B)** Metaphore Pharmaceutical Inc. (MetaPhore Pharmaceuticals Inc., Estados Unidos) são compostos derivados de ligantes cíclicos não aromáticos. **(C)** Estruturas de porfirinas de manganês comumente utilizadas como miméticos de superóxido-dismutase (Sod). A região contendo o metal manganês dos miméticos de Sod atua cataliticamente na reação de dismutação do O₂^{•-}, mudando a sua valência entre Mn³⁺ e Mn²⁺ (adaptado de Munroe, *et al.*, 2007).

1.3.3 Modelos biomiméticos da superóxido dismutase

Estudos indicam que modelos funcionais da Sod têm potencial para auxiliar no tratamento de condições em que o radical $O_2^{\cdot -}$ é produzido em excesso. Consequentemente, a utilização de enzimas superóxido dismutase e Sods modificadas tem sido sugerida como uma terapia útil para combater a ação desses radicais na patogênese de doenças inflamatórias, degenerativas e/ou metabólicas (Safavi, *et al.*, 2010). No entanto, a aplicação das Sods naturais é limitada pelo seu alto custo e meia-vida plasmática curta, além de algumas outras desvantagens da sua biodisponibilidade oral, estabilidade química, permeabilidade celular e imunogenicidade. Deste modo, compostos miméticos de Sod de baixo peso molecular foram potencialmente estudados para ultrapassar estas limitações (Safavi, *et al.*, 2010).

A maioria dos miméticos de Sod foram projetados com um centro metálico redox ativo, semelhante ao existente no sítio ativo das Sods naturais, isto é, contendo metais, tais como o Cu^{2+} ou Mn^{2+} , que permitem a mudança de oxidação do metal durante o processo catalítico. Um composto Sod mimético ideal deve ser estável, com alta especificidade para a interação com $O_2^{\cdot -}$ e com uma constante de velocidade alta; também não deve ser tóxico, bem como os Sods nativas. Além disso, seu tamanho e carga podem ser exploradas para a segmentação destes compostos em sítios celulares relacionados com a gênese do estresse oxidativo (Patel & Day, 1999; Sheng, *et al.*, 2014). Como descrito anteriormente, a busca de compostos eficazes e estáveis, resultou no desenvolvimento de pelo menos três classes de Sod miméticos contendo o metal manganês. Estes incluem os compostos miméticos a Sods demonstrados na figura 6.

Os compostos do grupo Salen têm apresentado um excelente potencial para o tratamento de uma grande variedade de doenças associadas com a geração do radical superóxido, tendo sido testados em modelos animais de doenças humanas, revelando resultados promissores (Salvemini, *et al.*, 2003). Tais pesquisas além de ajudar a compreender os mecanismos das doenças causadas pelo estresse oxidativo e fornecer alternativas terapêuticas, também fornecem novas informações acerca das necessidades de alteração dos compostos para que tenham eficácia otimizada (Johnson, F., Giulivi, C., 2005).

Os compostos Sod miméticos da Metaphore são complexos de manganês altamente estáveis derivados de ligantes macrocíclicos substituídos por bis (ciclohexilpiridina) que retêm a atividade de Sod na presença de EDTA. Eles são relatados para reagir especificamente com $O_2^{\cdot -}$ e não com outras EROs ou ERNs. O composto ativo

M40403 (Figura 6) demonstrou ser eficaz em uma variedade de modelo de estudo, tais como lesão de isquemia-reperfusão em coração de ratos e inflamação também em ratos (Riley, D. P., 1999; Munroe, *et al.*, 2007).

Irwin Fridovich, Ivan Spasojevic, Ines Batinic-Haberle e colaboradores foram pioneiros no uso de complexos de manganês com ligantes de tetraarilporfirina solúveis em água como miméticos de Sod (Batinic-Haberle, *et al.*, 1998). Dentre esses compostos, o MnTBAP exibe atividade de Sod *in vitro* tendo sido relatado para este composto: (i) a proteção de *E. coli*, deficiente nas enzimas Sod's, ao estresse oxidativo gerado durante o crescimento em aerobiose; (ii) a redução do estresse oxidativo mitocondrial em hepatoblastos humanos induzido pelo inibidor nucleosídico da transcriptase reversa, a estavudina; e (iii) por melhorar a sobrevivência dos neurônios deficientes em Sod2 (Faulkner, K. M., Liochev, S. I & Fridovich, I. 1994; Velsor, *et al.*, 2004; Patel, M. N, 2003). Este composto também melhorou a sobrevivência de camundongos deficientes em Sod2, embora não tão bem como Euk-8 ou Euk-134, compostos da Eukarion. Diversos miméticos de Sod à base de manganês tetrapiridil-porfirina, tais como MnTM-2-PyP, também foram desenvolvidos, e alguns são relatados como sendo mais eficazes do que MnTBAP (Batinic-Haberle, *et al.*, 1998; Munroe, *et al.*, 2007).

Apesar de não muito usual aos químicos bioinorgânicos, alguns complexos de ferro que exibem atividade de superóxido dismutase já foram relatados na literatura (Horn Jr., *et al.*, 2010; Ribeiro, *et al.*, 2015; Ribeiro, *et al.*, 2017). No entanto, tais compostos não se mostraram promissores devido a geração de radical hidroxila. Esta formação de radical hidroxila pode ocorrer pela dissociação do ligante com o metal (baixa estabilidade do composto), liberando Fe^{2+} . Desta forma, os íons Fe^{2+} podem gerar o $\text{HO}^{\bullet}$ pela reação de Fenton na presença do H_2O_2 , produto da reação de dismutação do $\text{O}_2^{\bullet -}$. Diante disso, deve-se atentar para a estabilidade do complexo (Riley, D. P., 1999).

1.3.4 Modelos biomiméticos da Catalase

Inicialmente o desenvolvimento de compostos que mimetizavam a atividade catalítica da catalase visava modelos para o estudo do mecanismo de dismutação do H_2O_2 . A maioria dos compostos relatados que apresentam atividade de catalase são de manganês, contrariando a baixa incidência das Mn-Cat em sistemas vivos. Os modelos de catalase contendo centro de ferro foram baseados principalmente em estruturas do tipo heme, como nas Fe-Cat naturais. Também podemos encontrar compostos miméticos de ferro com estruturas não-heme, no entanto esses compostos têm sido menos investigados.

Da mesma forma que para os compostos miméticos a Sod, o desenvolvimento de miméticos da catalase visa à aplicação dos mesmos como agentes terapêuticos contra doenças relacionadas com o estresse oxidativo. Por exemplo, o complexo Euk-8 (Figura 6, letra A) exibe propriedades de catalase, além de efeito protetor em células contra as EROs (Baker, K., *et al.*, 1998).

A atividade catalase das metaloporfirinas (Figura 6, letra C) poderia ser atribuída ao seu sistema extensivo do anel conjugado que sofre oxidação de um elétron reversível, bem como os grupos prostéticos heme de catalases e peroxidases endógenas. Em geral, metaloporfirinas que apresentam elevada atividade Sod mimética, também possuem uma maior atividade mimética a catalase, sendo capazes de proteger as células a partir de uma quantidade tóxica de H_2O_2 (Patel & Day, 1999). Apesar da atividade comprovada de muitos dos compostos miméticos a enzima catalase, o seu uso em sistemas biológicos se torna limitado, pois realizam a decomposição do H_2O_2 somente em solventes orgânicos e em valores de pH não fisiológicos (Paschke, J., *et al.*, 2001).

1.4 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de múltiplas propostas

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo unicelular e eucariótico que tem sido bastante utilizada para estudos em biologia celular e molecular, bioquímica e fisiologia das células eucarióticas. As células desta levedura possuem diversas semelhanças com as células animais, tanto em relação às organelas existentes quanto em relação às biomoléculas produzidas. Estudos comparativos demonstraram que pelo menos 60% dos genes de levedura possuem homólogos humanos, e além disso, mais de 25% de genes relacionados às doenças em humanos possuem ortólogos (homologia funcional) próximos em levedura. Nesse cenário, proteínas de *S. cerevisiae* têm mostrado capacidade de substituir proteínas humanas e *vice-versa* (Mager, W. H., *et al.*, 2010). A composição da membrana lipídica, os mecanismos de enovelamento proteico, propriedades e funcionamento das mitocôndrias, controle do ciclo celular, mecanismos de morte celular programada e, ainda, propriedades do transporte vesicular são algumas das características das células humanas conservadas em *S. cerevisiae*, e que podem ser perfeitamente estudadas nesse modelo celular (Khurana & Lindquist, 2010).

A facilidade de obtenção de mutantes através das técnicas de genética clássica e molecular, o cultivo em meios de cultura de composição simples, o pequeno tempo de geração quando comparado com as células animais, além do mapeamento completo do

seu genoma são pontos positivos que conferem a levedura *S. cerevisiae*, o status de excelente modelo de estudo em diversas áreas do conhecimento, tal como a sua aplicação no estudo de patologias humanas, incluindo doenças neurodegenerativas (Costa & Moradas-Ferreira, 2001., García-Fernández, A., *et al*, 2002). Os mecanismos básicos e as vias relacionadas ao desenvolvimento de doenças, tais como a disfunção mitocondrial, problemas na transcrição, defeitos no tráfego de vesículas e o prejuízo na função do proteassoma também são eventos muito conservados entre humanos e leveduras, o que torna mais um atrativo para o uso da *S. cerevisiae* como modelo de estudo (Tenreiro; Outeiro, 2010).

1.4.1 Estágios de Crescimento

O crescimento da levedura *S. cerevisiae* em meios sintéticos possui alguns estágios que podem ser explorados para o seu uso como modelo de estudo em laboratórios de pesquisa. Após o inóculo das células e uma rápida adaptação ao meio de cultivo, a proliferação de *S.cerevisiae*, quando na presença de glicose, se dá através do metabolismo fermentativo. Usualmente, a este estágio da proliferação celular dá-se o nome de primeira fase exponencial do crescimento. Em vias gerais, neste estágio, as células se caracterizam por apresentar uma rápida proliferação celular, devido ao metabolismo fermentativo, e serem suscetíveis a repressão catabólica, processo fisiológico exercido pela glicose. A repressão catabólica é um processo ativado pela disponibilidade de glicose que ao ativar sensores de glicose, tais como Ras2, ativa uma cascata de sinais que levam a repressão de alguns genes que codificam enzimas e proteínas responsáveis pela biossíntese e funcionamento das mitocôndrias (ex. sistema antioxidante e cadeia transportadora de elétrons), além de outros processos dependentes do O₂. Neste cenário, as células são capazes apenas de realizar o processo de fermentação alcoólica para produção energética. Quando a glicose é consumida, as células entram em uma fase adaptativa, chamada de diauxia, onde não há crescimento, mas que leva a ativação de vias de sinalização para expressão de genes envolvidos na resposta ao O₂. Após a adaptação, as células voltam a se multiplicar utilizando o metabolismo respiratório, onde a nova fonte de carbono utilizada é o etanol produzido durante a fermentação. Quando esta fonte de carbono é exaurida, as células entram em fase estacionária. Cabe ressaltar que em termos de tolerância celular às condições de estresse, tais como a toxidez das EROs, choque térmico, alcoólico e osmótico bem como a desidratação das células, a resposta celular é bastante distinta entre os diferentes estágios de crescimento. Portanto, células em metabolismo

respiratório ou em fase estacionária possuem uma maior resistência aos diferentes tipos de estresse do que células em metabolismo fermentativo (Toledano, M. B., 2003). Além da redução da atividade dos sensores de glicose, que reprimem a expressão de diversos genes de proteção celular, a respiração confere aumento da resistência contra os estresses, também por ativar vias de sinalização que promovam a síntese de fatores de proteção celular, tais como o sistema antioxidante (Toledano, M. B., 2003).

1.4.2 A resposta de *S.cerevisiae* ao estresse oxidativo

Ao realizar o metabolismo fermentativo, *S. cerevisiae* apresenta o sistema antioxidante com pouca representatividade. No entanto, quando as células crescem na presença de fontes de carbono não repressoras, tais como maltose, lactose, glicerol ou etanol, o metabolismo respiratório está ativo, e dessa forma, a expressão do sistema antioxidante é induzido desde o início de seu crescimento (Moradas-Ferreira, P., *et al.*, 1996). Por outro lado, *S. cerevisiae* é capaz de detectar o aumento dos níveis de oxidação intracelular e com isso desencadear respostas celulares que ativam o sistema antioxidante. Desta forma, as células sintetizam suas moléculas protetoras em decorrência: (a) de estímulos que podem ser dados por variadas condições de estresse; (b) da transição do metabolismo fermentativo para o respiratório; (c) aumento da atividade mitocondrial; e (d) diminuição da capacidade de defesa antioxidante devido ao aumento das EROs (Pereira, M. D., 2003). Em linhas gerais, a resposta adaptativa ao estresse consiste em: uma resposta rápida e primária, que promove uma proteção imediata a condições de estresse brando; e uma resposta lenta e secundária, responsável por uma proteção mais eficiente em relação a condições de estresse mais severas. A resposta primária consiste na ativação de todo um sistema de proteção pré-existente, bem como a ativação de um mecanismo de transdução de sinais, responsável por ativar a resposta secundária, caracterizada pela síntese “*de novo*” de proteínas e moléculas que respondem aos mecanismos de proteção celular (Costa & Ferreira, 2001).

A resposta adaptativa e imediata a uma mudança nas condições ambientais, como temperatura, osmolaridade e disponibilidade de nutrientes, é especialmente importante para microrganismos devido à sua mobilidade limitada. Na levedura, a resposta geral ao estresse engloba um conjunto de genes envolvidos na proteção celular a diversas condições desfavoráveis. Estes genes contêm elementos *cis* reguladores designados por elementos responsivos ao estresse (STRE - Stress Responsive Element), que servem como locais de ligação para os fatores de transcrição do tipo zinc-finger, tais como Msn2

e Msn4. Sob condições de estresse, a atividade da proteína cinase A (repressora da resposta ao estresse) é inibida, provocando a migração de Msn2 e Msn4 do citosol para o núcleo onde são capazes de se ligar a região promotora, induzindo a expressão de diversos genes em resposta ao estresse. Portanto, a transcrição cooperativa de genes regulados por elementos STRE pode conferir resistência geral a qualquer tipo de estresse.

Por outro lado, dependendo da especificidade do estímulo, outros elementos responsivos podem ser necessários para uma completa resposta ao estresse. Nesse cenário, o elemento de choque térmico (HSE – Heat Shock Element) é reconhecido em diversas regiões promotoras pelo fator de transcrição Hsf1 (Heat Shock Factor - HSF), responsável pela transcrição genética sustentada e transitória a temperaturas elevadas (Estruch, 2000; Garreau, *et al.*, 2000). Em geral, as ligações desses fatores de transcrição aos seus respectivos elementos no DNA induzem a expressão de uma série de genes, tais como, *SOD2* e *CTT1*, induzidos pelos fatores de transcrição Msn2/Msn4 e *CUP1* e *CTT1* induzido por Hsf1 (Morano, K. A., Grant, C. M & Moye-Rowley, W. S., 2012). A resposta celular a uma condição de estresse promove, muitas vezes, à síntese de um grupo de proteínas denominadas de proteínas de choque térmico (heat shock proteins – HSPs), bastante importante para o processo de aquisição de tolerância ao estresse térmico. A síntese destas proteínas também pode ser induzida por diferentes tipos de estresse, tal como o estresse oxidativo causado pelo aumento intracelular de EROs (Morano, K. A., Grant, C. M & Moye-Rowley, W. S., 2012). As HSPs foram denominadas de acordo com suas massas moleculares aparentes dando origem ao grupo das proteínas Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e as HSPs de baixo peso molecular.

Em contraste com as chaperonas previamente descritas, a proteína de levedura Hsp104 juntamente com HSPs de baixo peso molecular atuam através de complexos oligoméricos *in vivo* e *in vitro*. Ao contrário da maioria de outras chaperonas, a Hsp104 está envolvida na formação e solubilização de agregados de proteínas, sendo capaz de extrair as proteínas mal enoveladas a partir de agregados, seguido pela translocação através do canal central da proteína. A Hsp104 não é capaz de re-enovelar proteínas por si só, sendo dependente da Hsp70 para resgatar a conformação nativa apropriada, como demonstrado na figura 9 (Haslbeck, *et al.*, 2005; Saibil, 2013). A Hsp104 também é uma das poucas proteínas chaperonas de levedura, que são totalmente necessárias para aquisição de termotolerância, uma vez que células deficientes na síntese da Hsp104 (*hsp104Δ*) são extremamente sensíveis ao choque térmico. Contudo, sabe-se que esse

seleto grupo de proteínas também tem participado na proteção de *S. cerevisiae* na resposta ao estresse provocado pelas EROs.

Com relação a resposta ao estresse oxidativo, *S. cerevisiae* é dependente do fator de transcrição Yap1. A ativação de Yap1 é crucial para a indução da resposta e consequentemente aumento da tolerância ao estresse oxidativo (Menezes *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2015). Atualmente, sabe-se que a Yap1 é ativada na presença de H₂O₂ ou agentes modificadores de grupamentos tióis, tal como a menadiona, uma naftoquinona capaz de gerar estresse oxidativo por levar a produção de radical superóxido, bem como atacar grupamentos tióis. A proteína Yap1 contém na sua parte C-terminal um sinal de exportação nuclear; em condições fisiológicas normais, ou seja, quando não há estresse oxidativo, Yap1 se mantém localizada no citoplasma. Contudo, quando a célula é exposta a agentes oxidantes, Yap1 é ativada e exportada para o núcleo, regulando a expressão de vários genes de proteção antioxidante, tais como *SOD1* (que codifica a Cu/Zn Superóxido dismutase), *TRX* (que codifica a Tiorredoxina), *GSH1* (que codifica o tripetídeo GSH), *GPX* (que codifica a Glutational Peroxidase) e *GLR1* (Glutational Oxidorredutase) (Pimentel *et al.*, 2014). É importante ressaltar que tanto a resposta específica, regulada por Yap1, bem como a geral, via Msn2 e Msn4, ao estresse oxidativo, são ativadas pela alteração do estado redox intracelular (Ribeiro *et al.*, 2015; Ribeiro, T. P. 2016). Desta forma, fatores de transcrição, que tenham uma resposta geral ou específica ao estresse, são recrutados para ativar um mecanismo de resposta que leve a adaptação das células a distintas condições de estresse.

2. JUSTIFICATIVA

A utilização do oxigênio pelos organismos aeróbios pode resultar na produção de uma série de metabólitos nocivos às estruturas celulares. Quando a produção e o acúmulo destes metabólitos, conhecidos como Espécies Reativas do Oxigênio (EROs), excedem a capacidade antioxidante da célula, uma condição conhecida como estresse oxidativo é estabelecida. Algumas patologias, tais como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doenças respiratórias e doenças neurodegenerativas estão associadas como causa e/ou consequência do estresse oxidativo (Gottlieb, *et al*, 2010).

Neste cenário, substâncias antioxidantes desempenham um papel importante na saúde humana, pois neutralizam a ação das EROs, bem como progressão dos processos oxidativos, reduzindo a oxidação das biomoléculas (Oliveira, *et al*, 2009). Na tentativa de reduzir, ou mesmo evitar, os danos causados pelo estresse oxidativo, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de isolar da natureza, ou que seja sintetizar, compostos antioxidantes. O desenvolvimento de novas moléculas com potencial antioxidante tem sua importância, pois visa proteger eficazmente os organismos dos agentes que provocam o estresse oxidativo (Almeida, *et al.*, 2013). Nos últimos anos, diversos compostos de coordenação foram sintetizados, com o objetivo de mimetizar a atividade de enzimas antioxidantes, tais com a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Alguns desses compostos já se encontram em fase de testes clínicos em humanos, porém outros, mesmo que não cheguem a fase de teste clínico, podem, futuramente, servir como protótipos para a produção de novos compostos que sejam mais eficazes. Sendo assim, o estudo de novas moléculas com potencial antioxidante é de grande importância, pois tem como características a capacidade de reduzir ou inibir as lesões causadas por radicais livres (EROs e/ou ERNs), melhorando a qualidade de vida dos indivíduos.

Estudos recentes do nosso grupo, mostraram a capacidade antioxidante de 3 compostos de coordenação com atividade mimética às enzimas superóxido dismutase e catalase (Ribeiro *et al.*, 2015; Ribeiro, *et al.*, 2017). Tais compostos aumentaram a tolerância de *Saccharomyces cerevisiae*, e reduziram os marcadores de oxidação quando as células foram expostas ao estresse oxidativo (Ribeiro *et al.*, 2015; Ribeiro, *et al.*, 2017). Além disso, também foi mostrado que a captação destes compostos interferiu na dinâmica das partículas lipídicas (lipid droplets), bem como na homeostase de metais (Ribeiro *et al.*, 2015; Ribeiro, *et al.*, 2017). Estes dados, juntamente com os dados de estabilidade química comprovaram que os compostos apresentavam excelente potencial terapêutico como metalofármacos antioxidantes. Com base na relevância do estudo, nas evidências apresentadas pelo nosso grupo e na validação da *S. cerevisiae* como eficiente modelo para

estudo, esses dados mostram a importância da continuidade do estudo, bem como na identificação de novos compostos de coordenação antioxidantes. Esta busca torna-se relevante para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, que visem combater os danos causados pelo estresse oxidativo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Empregando a levedura *S. cerevisiae* como modelo de estudo, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante, mimético às enzimas superóxido dismutase e catalase, de sete compostos de coordenação contendo Fe^{3+} como centro de coordenação.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar a atividade antioxidante de sete compostos de coordenação contendo íons Fe^{3+} .

- a) Verificar *in vitro* a atividade de superóxido dismutase (Sod) e/ou catalase (Cat) dos compostos de coordenação;
- b) Determinar os níveis de sobrevivência ao estresse oxidativo da levedura *S. cerevisiae* tratada com os compostos de coordenação;
- c) Avaliar o efeito dos tratamentos com os compostos de coordenação na disfunção mitocondrial de *S. cerevisiae* expostas ao estresse oxidativo;

3.2.2. Investigar a indução da resposta celular ao estresse oxidativo após o tratamento com os compostos de coordenação:

- a) Avaliar a necessidade do fator de transcrição Yap1 para a resposta de *S. cerevisiae* tratadas com os compostos de coordenação;
- b) Determinar a capacidade de indução da expressão da proteína de choque térmico Hsp104 em *S. cerevisiae* tratadas com os compostos de coordenação;
- c) Avaliar a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em *S. cerevisiae* tratadas com os compostos de coordenação;

3.2.3. Determinar a absorção dos compostos de coordenação em *S. cerevisiae* tratadas com os compostos de coordenação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Determinação *in vitro* da atividade Sod mimética

A atividade Sod mimética foi avaliada *in vitro* através do método de inibição da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) à formazan. Na presença de um sistema formador de radicais superóxido o reagente NBT é reduzido a formazan. No entanto, na presença de antioxidantes miméticos a Sod (compostos de coordenação), os radicais superóxido são eliminados inibindo a redução do NBT a formazan (Faulkner, K. M, *et al.*, 1994). Para geração do radical superóxido foi utilizado o sistema enzimático xantina/xantina oxidase (Sigma-Aldrich). A Figura 8 ilustra as reações de redução do NBT através do sistema enzimático utilizado. As soluções de xantina, NBT e xantina oxidase foram preparadas nas concentrações 4,5 μM , 0,56 μM e 5,0 U/mL, respectivamente, utilizando a solução tampão fosfato 0,05 M. O meio reacional foi preparado diretamente em cubeta de vidro e continha 1,0 mL da solução de xantina, 1,0 mL de NBT e 200,0 μL da solução tampão fosfato pH 7,8. Em seguida, adicionou-se rapidamente 100,0 μL da solução de xantina oxidase e iniciou-se a medida da variação da absorvância. Para obtenção da taxa de absorção na presença do composto, o volume de solução de tampão fosfato foi substituído pelo mesmo volume da solução do composto na concentração de 0,87 μM preparado em DMSO/água (1:9). Logo, adicionou-se 200,0 μL da solução de cada composto diretamente às soluções de xantina e NBT, na cubeta, em seguida adicionou-se rapidamente 100 μL xantina oxidase, iniciando-se a medida da taxa de absorção. As medidas foram feitas a cada 2 segundos ao longo de 20 minutos em espectrofotômetro ajustado a 560 nm. Todos os experimentos foram feitos em duplicata. A porcentagem de inibição de redução do NBT foi calculada através da relação entre o experimento sem adição de composto e aquele na presença do composto (Gonzalez-Alvarez, M, *et al.*, 2005).

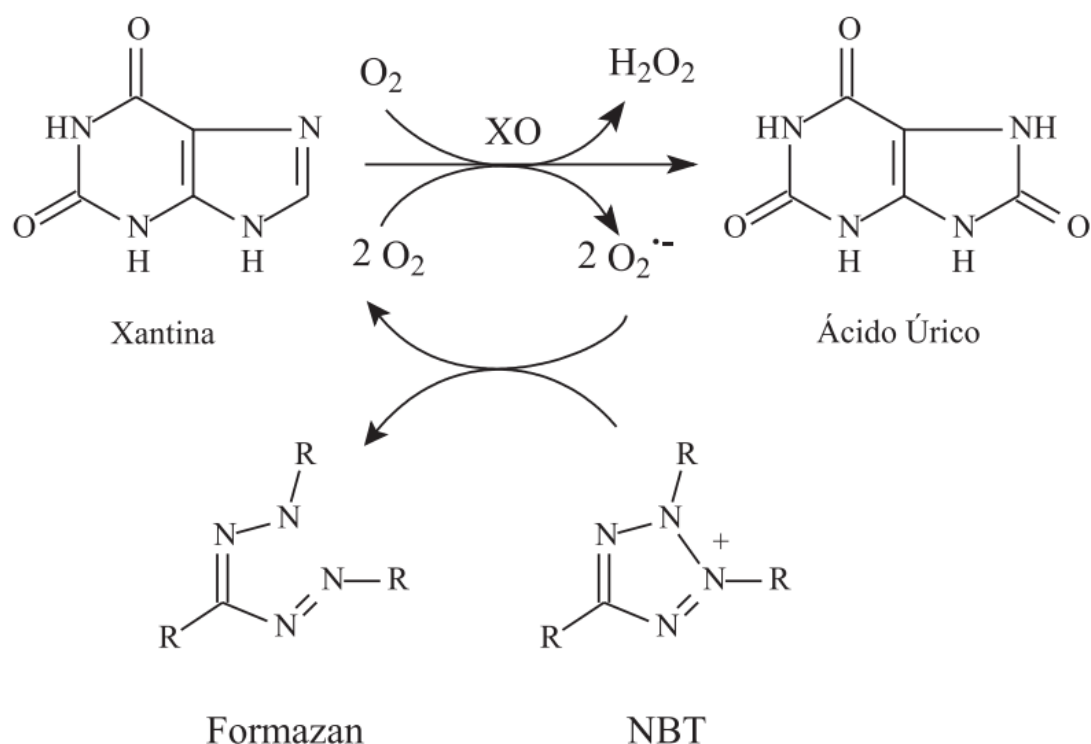


Figura 7. Representação esquemática da redução do NBT pelo radical superóxido (adaptado de Alves & David *et al.*, 2010).

4.2. Determinação *in vitro* da atividade Cat mimética

A atividade Cat mimética foi determinada através do método descrito por Beers & Sizer, 1952. Este método se baseia na medida da absorção da radiação ultravioleta do peróxido de hidrogênio em função do tempo. Esse método permite o acompanhamento da reação de decomposição do peróxido de hidrogênio na presença ou ausência dos compostos de coordenação. Os testes foram realizados em cubeta de quartzo utilizando-se 2,0 mL da solução de tampão fosfato pH 7,8 ao qual foi adicionado 50 μ L da solução do composto na concentração de 0,2 μ M preparado em DMSO/água (1:9) e 200,0 μ L de peróxido de hidrogênio a 0,16 mM. A medida da taxa de consumo de peróxido de hidrogênio foi medida em espectrofotômetro ajustado a 240 nm por 12 minutos. Os resultados foram expressos através da taxa de consumo de peróxido de hidrogênio em mM/segundo.

4.3. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas e condições de cultivo

Para a avaliação do potencial antioxidante dos compostos, bem como a indução da resposta celular ao estresse, foram utilizadas as cepas de *S. cerevisiae* descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

Cepas	Genótipos
EG103* (selvagem)	<i>MATa; leu2-3,112; his3Δ1; trp-289a; ura3-52; GAL+</i>
EG118* (<i>sod1Δ</i>)	Isogênica a EG103 exceto por <i>YJR104c::URA3</i>
<i>yap1Δ</i> [§]	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0, YML007w::kanMX4</i>
<i>hsp104-GFP</i> [#]	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0, [RNQ+], HSP104-GFP-His3MX</i>

* Esta cepa foi gentilmente cedida pela Dra. Edith Butler Gralla, da Universidade da Califórnia, Los Angeles, Estados Unidos; [§] Esta cepa foi adquirida da Euroscarf, Frankfurt, Alemanha; [#] Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Prof. Simon Alberti, do Max Planck Institute, Dresden, Alemanha.

Para a realização dos experimentos deste trabalho, todas as cepas foram cultivadas em meio sintético líquido YPD 2% (1% extrato de lêvedo, 2% glicose, 2% peptona) e mantidas a 28°C em incubadora com agitação ajustada para 160 rpm. As células foram sempre coletadas em metabolismo fermentativo, ou seja, na metade da primeira fase exponencial do crescimento celular (0,8 mg peso seco/mL). Os estoques destas cepas foram mantidos em meio sólido YPD 2% (1% extrato de lêvedo, 2% glicose, 2% peptona e 2% ágar) em condições apropriadas para evitar a seleção de *petites* ou supressores. No caso da cepa mutante *yap1Δ*, o meio de cultivo onde foram mantidas, foi suplementado com 0,002% de geneticina.

Para os ensaios de microscopia de fluorescência, foi utilizada a cepa BY4741 modificada geneticamente para expressar a proteína de choque térmico Hsp104 (*Heat shock protein 104*), uma chaperona que atua em resposta ao estresse térmico com função

de desagregase, fusionada a proteína verde fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein* - GFP) em seu terminal carboxila (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*, [RNQ+], HSP104-GFP-His3MX).

4.4. Compostos de coordenação, preparo das soluções e condições para o tratamento das células

Neste trabalho estão apresentados apenas as estruturas dos compostos já descritos na literatura. Assim, as estruturas dos compostos da série A, C1 e C2 podem ser visualizadas abaixo, na figura 8 (Horn Jr, et al., 2010; Machado, *et al.*, 2015). Por outro lado, as estruturas dos compostos da série A, C3 e C4, bem como dos compostos da série B, C5, C6 e C7 não serão apresentadas nesta Dissertação, tendo em vista a futura proteção da sua síntese, bem como da aplicação dos compostos junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. Tais compostos são inéditos sem nenhum relato sobre sua síntese e aplicação biológica. Todos os compostos foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo grupo do Prof. Adolfo Horn Junior, do Laboratório de Ciências Químicas, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

Para preparo das soluções de trabalho dos compostos de coordenação, primeiramente foi feito uma solução estoque a 25.0 mM de cada um dos compostos da série A em DMSO, e da série B em água. Todas as soluções foram armazenadas em geladeira a 4°C por até seis meses. A partir destas soluções estoque foram feitas diluições necessárias para que fosse obtido as concentrações de tratamento das células para cada composto. Os tratamentos com os compostos foram realizados adicionando-se os compostos, diretamente, ao meio de cultivo que continha as células e incubados por 1 h, sob as mesmas condições utilizadas para o crescimento das células descritas no subitem 4.3. Após os tratamentos, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas por duas vezes com H₂O estéril, e reservadas para a realização dos experimentos posteriores.

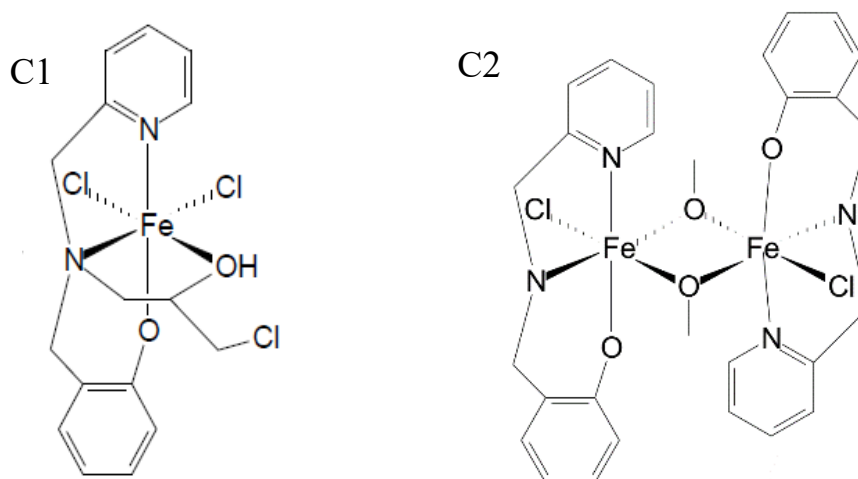


Figura 8. Estrutura química dos compostos de coordenação da série A. **C1**: $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})\text{Cl}_2]\text{NO}_3$ (450,55 g/mol) e **C2**: $[\text{Fe}_2(\text{BPA})_2(\mu\text{-OCH}_3)_2(\text{Cl})_2]$ (741,23 g/mol); Os compostos foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo grupo do Prof. Adolfo Horn Junior, UENF (adaptado de Horn Jr, et al., 2010 e Machado, *et al.*, 2015).

4.5. Condições para exposição das células ao estresse oxidativo

A fim de analisar o potencial antioxidante dos compostos de coordenação, as células foram submetidas ao estresse oxidativo causado pela menadiona. Ao ser absorvida pelas células, a metabolização da menadiona leva a produção de radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$, causando o estresse oxidativo. Sendo assim, as cepas EG103 e *sod1Δ*, com ou sem o tratamento com os compostos de coordenação, foram incubadas durante 1 h com 20 mM de menadiona. Para tal, foram pesadas quantidades de menadiona equivalente à concentração (20 mM) final desejada no ensaio. A menadiona foi, então, adicionada e diluída diretamente no meio de cultivo contendo as células. Após a adição da menadiona, as células foram submetidas as mesmas condições de cultivo, descritas no subitem 4.3. Após o período de estresse, as células foram coletadas por centrifugação e utilizadas para análises da sobrevivência celular.

4.6. Determinação do efeito dos compostos na sobrevivência das células de *S. cerevisiae*

A sobrevivência das células após as condições descritas anteriormente foi analisada através de plaqueamento das células em meio sólido YPD 2%. O plaqueamento foi realizado antes e após as condições de estresse oxidativo, bem como em células tratadas ou não com os compostos de coordenação e estressadas com menadiona. O plaqueamento foi realizado em triplicata, após diluições apropriadas (1.000 x) para a contagem das colônias. As placas foram incubadas a 28°C por 72 h, e, após esse tempo, o número de colônias foi contado. A porcentagem de sobrevivência foi calculada a partir da relação entre o número de colônias obtidas após e antes do processo de estresse oxidativo.

4.7. Determinação do efeito dos compostos na disfunção mitocondrial em *S. cerevisiae*

A disfunção mitocondrial foi analisada por plaqueamento em meio sólido YPGly4%, antes e após as condições de estresse oxidativo, com ou sem os tratamentos com os compostos de coordenação. O plaqueamento foi realizado em triplicata, após diluições apropriadas (1.000 x) para a contagem das colônias. As placas foram incubadas a 28°C por 72 h, e, após esse tempo, o número de colônias foi contado. A porcentagem de células com disfunção mitocondrial (*petites*) foi calculada a partir da relação do número de colônias obtidas no plaqueamento em YPD 2% menos o número de colônias em YPGly 4% dividido pelo número de colônias da condição em YPD 2%, conforme a fórmula abaixo.

$$\frac{(\text{N}^{\circ} \text{ de colônias YPD 2\%} - \text{N}^{\circ} \text{ de colônias YPGly 4\%})}{\text{N}^{\circ} \text{ de colônias YPD2\%}}$$

4.8. Análise do envolvimento do fator de transcrição Yap1 na resposta ao estresse oxidativo

As células da cepa mutante *yap1Δ* foram cultivadas e submetidas ao tratamento com os compostos miméticos, conforme descrito anteriormente, nos subitens 4.3 e 4.4. Após o tratamento, as células *yap1Δ* foram submetidas a um estresse com 20 mM de menadiona, como descrito no subitem 4.5. Em seguida, as células foram coletadas, e a concentração celular foi ajustada para uma concentração final de 0,02 mg/mL em um volume final de 100 μ L em placa de 96 poços. Diluições sucessivas (de 10^{-1} até 10^{-4}), foram realizadas e 5,0 μ L de cada diluição e de cada condição foram aplicados, com uma pipeta multicanal, diretamente em placas de Petri contendo meio YPD 2% sólido (Figura 9).

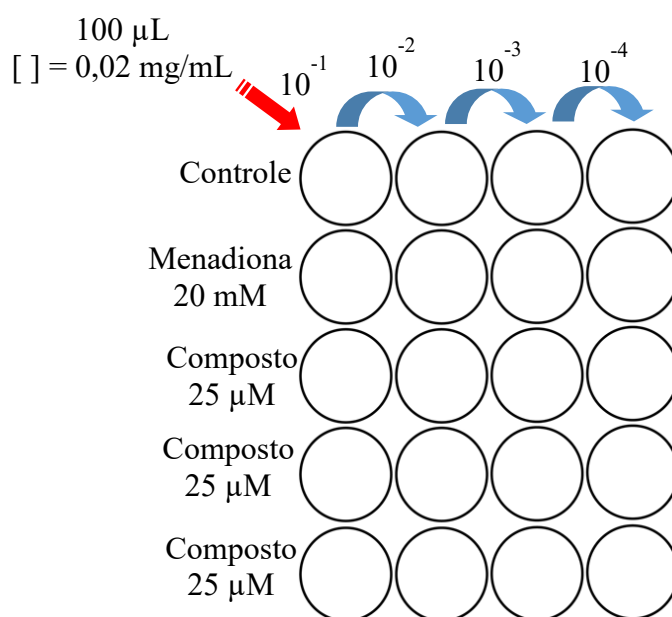


Figura 9: Esquema das diluições seriadas na placa de *réplica plate*.

4.9 Avaliação da expressão da proteína de choque térmico Hsp104 após o tratamento com os compostos de coordenação

A determinação da expressão da Hsp104 fusionada a proteína verde fluorescente GFP, foi verificada ao submeter as células contendo a construção Hsp104-GFP ao tratamento térmico a 40°C, condição utilizada como controle positivo, e apenas aos tratamentos com os compostos, assim como descrito no item 4.4. Imediatamente após os tratamentos as suspensões celulares foram coletadas e usadas para montar as lâminas para microscopia de fluorescência. A montagem das lâminas foi realizada utilizando-se N-propil galato como líquido de montagem e visualizada em microscópio de fluorescência Axioplan 2 (Zeiss, Germany). As imagens foram analisadas e processadas através dos softwares analySIS (Soft Image System) e ImageJ.

4.10 Determinação das atividades enzimática para Sod e Cat em *S. cerevisiae*

4.10.1 Obtenção do extrato livre de células.

Cerca de 50 mg de células foram centrifugadas a 5000 rpm e lavados duas vezes com água destilada. Após as lavagens as células foram ressuspensas em 500 µL de tampão fosfato pH 7,8 adicionando-se a seguir 1.5 g de pérolas de vidro. Os extratos celulares foram obtidos por 3 ciclos de agitação violenta em vórtex por 1 minuto, intercalados com 1 minuto no gelo. Os extratos celulares obtidos foram então centrifugados a 13.000 rpm, por 5 minutos, e o sobrenadante utilizado para as análises posteriores (Brasil *et al.*, 2013; Sá *et al.*, 2013).

4.10.2 Dosagem da concentração de proteínas nos extratos livre de células.

A determinação da concentração de proteínas no extrato bruto foi realizada utilizando o método descrito por Stickand (Stickland, 1951). Um volume de 100 µL de extrato bruto livre de células foi adicionado a 4,9 mL de água, 0,9 mL de uma solução contendo 20% NaOH e 150 µL de solução 25% CuSO₄. A absorvância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 550 nm. Os cálculos da concentração de proteínas dos extratos foram realizados a partir da construção de uma curva padrão com albumina bovina (10 mg/mL). Desta curva padrão foi retirado o valor do fator de conversão estabelecido para conversão da absorvância em unidade de concentração em mg de proteína/mL.

4.10.3 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase

A determinação da atividade de superóxido dismutase foi acompanhada pela inibição da redução do NBT após geração de radicais $O_2^{\cdot-}$, pela fotoreação da riboflavina segundo o protocolo de Flohé & Otting, 1984. Este ensaio é bastante conveniente para a determinação da atividade Sod, pois descarta a necessidade do uso de outras enzimas para gerar o radical $O_2^{\cdot-}$. Além disso, também permite a localização das isoformas Sod em géis de poliacrilamida. A atividade Sod foi determinada através de uma relação entre a atividade Sod de células tratadas e não tratadas com os compostos. Desta forma, a atividade Sod foi expressa através no número de vezes de aumento em relação ao controle (Brasil *et al.*, 2013; Sá *et al.*, 2013).

4.10.3.1 Gel de Resolução

A mistura para o gel de resolução 10%, nativo, foi preparada misturando-se, em um erlenmeyer, 4,0 mL de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 30%, 2,25 mL de tampão Tris/HCl 2 M pH 8,9, 6,6 mL de H_2O , 12,0 μL de TEMED e 120,0 μL de PSA 10%. A mistura foi suavemente agitada e aproximadamente 8,0 mL foram adicionados entre as placas de vidro do sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell, da BioRad, até que o topo fosse atingido. Imediatamente após a adição da mistura, o pente para a criação de poços foi colocado, e o sistema deixado em repouso por aproximadamente 1h a temperatura ambiente. Ao final da polimerização, o gel foi armazenado na geladeira, envolto em filme plástico, com uma pequena camada de água para evitar o ressecamento.

4.10.3.2 Condições de eletroforese, revelação e quantificação da atividade

Para a realização da eletroforese, o gel foi submerso em tampão de corrida 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glicina, pH 8,3. Foi preparado 20,0 μL de amostra, com o volume de extrato correspondente a 75,0 μg de proteína, 5,0 μL de tampão de amostra (125,0 μL de Tris/HCl 1,0 M pH 6,8, 800,0 μL de glicerol, 20,0 μL 1% azul de bromofenol e 55,0 μL de água) e o restante de H_2O até completar o volume de 20,0 μL . Foi aplicado no gel 20 μL de amostra. A eletroforese foi conduzida nas condições de temperatura ambiente, com corrente (150,0 mV) e amperagem (30,0 mA) por gel controlados por aproximadamente por 40 minutos, ou até que o front (corante) saísse do gel. Após a eletroforese, o gel foi cuidadosamente removido das placas de vidro e imerso em uma solução contendo 2,5 mM NBT em 36,0 mM de tampão fosfato (pH 7,8) por 15 minutos. Após este tempo, o

gel foi removido da solução de NBT e imerso em uma solução contendo 86,0 μM de riboflavina, 28,0 mM de TEMED e 100,0 mL de tampão fosfato 7.8 por 15 minutos, sendo em seguida exposto à luz (Brasil *et al.*, 2013; De Sá *et al.*, 2013; Flohé; Otting, 1984). Após a revelação, o gel de poliacrilamida foi digitalizado no fotodocumentador *EC3 Imaging System* (UVP Biomaging Systems), e as bandas de Sod foram analisadas levando-se em consideração a densidade por área com o uso do *software* UVP Vision Works LS 6.2. A atividade visualizada foi expressa em vezes de aumento em relação à condição controle.

4.10.4 Análise da Atividade de Catalase

A dosagem da atividade de catalase foi realizada por cinética enzimática, acompanhando a curva de progresso de consumo de H_2O_2 em espectrofotômetro a 240 nm. A determinação da atividade da enzima catalase foi realizada em células tratadas ou não com os compostos de coordenação. O branco de reação foi composto por 2,9 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7.0 e 100,0 μL do extrato bruto de proteína. A reação foi disparada pela adição de 36 μL de H_2O_2 880 mM. A curva de progresso foi acompanhada em espectrofotômetro modelo *Beckman Coulter DU 700* por 3 minutos, sendo as leituras realizadas de 10 em 10 segundos (Rona *et al.*, 2015). Os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg ptn), onde 1,0 U corresponde à degradação de 1 μmol de H_2O_2 por minuto.

4.11. Determinação da captação dos compostos de coordenação pelas células de *S. cerevisiae*

Células da cepa EG103 cresceram em meio YPD2% até metade da fase exponencial em glicose e em seguida foram submetidas ao tratamento com os compostos de coordenação, tal como descrito nos itens 4.3 e 4.4. Após os tratamentos, 100 mg de células foram coletadas por centrifugação (4000 rpm por 5 minutos) e, em seguida, lavadas duas vezes com PBS estéril. Em seguida, as células foram então congeladas por 48 h, a -80°C, e então descongeladas somente quando fossem incubadas para digestão com 1 mL ácido nítrico. Após 24 h de abertura das células com ácido nítrico, o material foi aquecido em um bloco digestor, a 100°C durante 4 h. O produto da digestão das células foi então diluído em 10 mL de água ultrapura e reservado para as análises no equipamento. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se o Espectômetro Nexion 300x ICP-MS (Perkien Elmer, USA), operando no modo padrão e equipado com um nebulizador concêntrico, uma câmara de spray ciclônico e um injetor de quartzo de 2 mm (Glass Expansion, AUS). As soluções foram introduzidas a um fluxo de 1.0 mL/min e a 40.0 g L⁻¹. Os resultados da concentração de metal foram expressos em µg de metal/g de célula. O cálculo foi realizado em amostras de células que foram submetidas ou não ao tratamento de 1 h com os compostos de coordenação. As células não tratadas serviram de controle para quantificar os níveis intracelulares basais de metal da célula.

4.12. Análises estatísticas

Para análise estatística dos resultados, foi feito o Teste T de Student, a fim de verificar as diferenças entre os grupos. Para a realização dos testes utilizou-se a ferramenta GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Nos gráficos, um asterisco (*) representa resultados significativamente diferentes para um valor de P <0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação *in vitro* das atividades de superóxido dismutase (Sod) e/ou catalase (Cat) dos compostos de coordenação.

A atividade mimética à metaloenzima superóxido dismutase (Sod) foi investigada para todos os 7 compostos de coordenação usados neste trabalho. Foi investigada a taxa de redução do azul de nitrotetrazólio na ausência dos compostos (controle), bem como na presença de 0,87 μM dos compostos. Em seguida a taxa de inibição da redução do NBT promovida pelos compostos em estudo foi avaliada.

Como podemos observar na figura 10, fica evidente o aumento da taxa de redução do NBT pelo sistema gerador de radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. No entanto, na presença dos compostos da série A (C1 – C4) e B (C5 – C7) a redução do NBT sofre uma forte inibição. Esta característica inibitória está diretamente relacionada a capacidade dos compostos em eliminar o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ formado pelo sistema xantina/xantina oxidase. Desta forma, todos os compostos foram capazes de inibir a redução do NBT, atuando como compostos miméticos à metaloenzima Sod. Nossos resultados mostram ainda que os compostos da série A foram mais eficazes que os da série B, tendo em vista que os compostos da série A apresentaram inibição da redução do NBT superior a 70%, enquanto que os compostos da série B apresentaram valores abaixo de 70% (Tabela 2). Portanto, podemos concluir que os compostos da série A mostraram uma atividade Sod mimética alta, enquanto que a atividade dos compostos C5 e C6 é considerada moderada e a do composto C7, baixa. Cabe ressaltar que dos 7 compostos testados neste estudo, somente os compostos C1 e C4 já haviam sido descritos na literatura como compostos capazes de eliminar radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$, tal como a enzima Sod (Horn e col., 2010; Melo, K. V., 2012). De fato, nossos resultados corroboram os dados obtidos por Melo, K.V. (2012) e Horn e colaboradores (2010) que observaram que C4 e C1, respectivamente, foram capazes de inibir a redução de NBT pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$. Quanto a atividade Sod mimética dos demais compostos, os resultados aqui apresentados são inéditos.

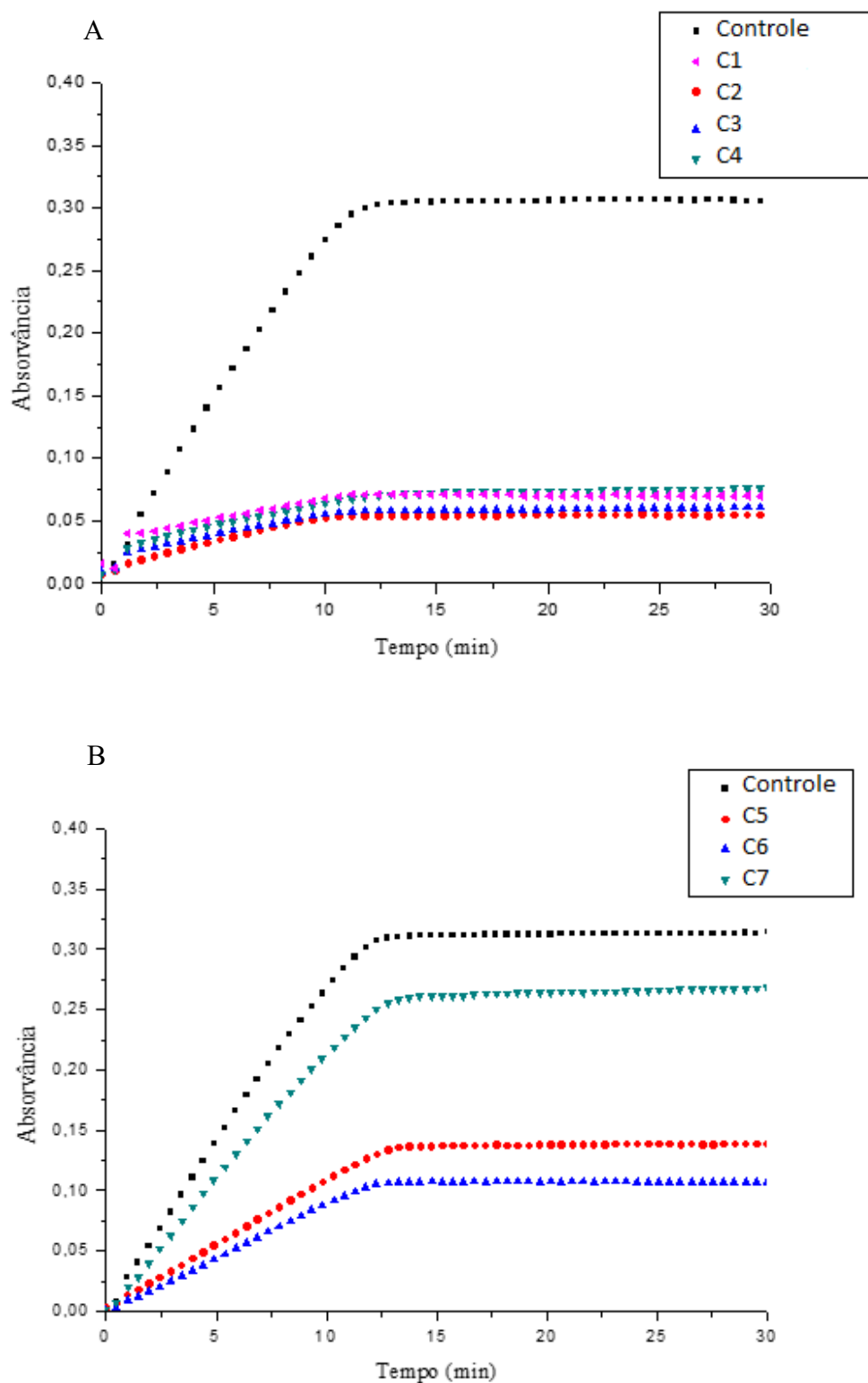


Figura 10. Curva de redução do NBT pelo sistema xantina/xantina oxidase, gerador de radical $O_2^{\bullet-}$. A redução do NBT foi realizada na ausência (controle) e na presença de 0,87 μM dos compostos da série A (**A**) e da série B (**B**). Os resultados obtidos em triplicata foram expressos em unidades arbitrárias de absorvância por tempo (min).

Tabela 2. Porcentagem de inibição da redução do NBT obtido para os compostos de ferro.

Composto (série A)	Inibição (%)
C1	81,7 ± 4,6
C2	84,3 ± 2,0
C3	83,3 ± 2,3
C4	78,3 ± 2,5
Composto (série B)	Inibição (%)
C5	54,5 ± 1,2
C6	65,0 ± 0,7
C7	12,9 ± 2,4

Embora nossos resultados não demonstrem diferenças significativas na atividade Sod mimética dos compostos da série A, Melo, K.V. (2012) em sua dissertação de Mestrado, empregando a mesma metodologia, demonstrou que o C4 exibiu uma atividade Sod mimética 18% superior ao apresentado pelo C1. Segundo Melo, K.V, esta diferença pode ser atribuída à diferenças na estrutura dos compostos C1 e C4. Por outro lado, Morcelli, S. R. (2016) em sua tese de Doutorado, demonstrou que o C1 apresentou uma atividade de Sod mimética alta, exibindo valores de inibição da redução do NBT de 73%, valores similares aos obtidos neste trabalho. Portanto, podemos concluir, que nossos resultados corroboram os dados já descritos na literatura em relação aos compostos C1 e C4.

Com relação a atividade mimética à metaloenzima catalase (Cat), todos os compostos também foram utilizados para investigar a taxa de eliminação de H₂O₂. Neste ensaio, os compostos foram utilizados na concentração de 0,2 µM. Os gráficos de consumo de H₂O₂ promovido pelos compostos estão apresentados na figura 11. Podemos observar que todos os compostos, tanto da série A quanto da série B, não apresentaram atividade catalase *in vitro*. Em nossos resultados, a concentração de 0,16 mM de H₂O₂ permaneceu praticamente constante durante todo o curso do experimento, 12 minutos. Nossos resultados mostram que os valores de absorbância mostrados no eixo X são menores que 1. De acordo com Melo, 2012 e Morcelli 2016, C1 e C4 também não foram capazes de degradar o H₂O₂ *in vitro*, não apresentando atividade catalase mimética. Podemos observar na figura 12 a diferença entre o composto C1, incapaz de degradar o

H₂O₂ e por isso apresentando valores de consumo de H₂O₂ na faixa de 2mM/min e o composto Fe(α)naftolHBPA que apresenta elevada atividade Cat mimética, com valores de consumo de H₂O₂ na faixa de 13 mM/min (Morcelli, S. R., 2016). Por outro lado, Horn e colaboradores (2010) ao determinar a atividade catalase *in vitro* por volumetria de O₂, demonstrou que C1 era capaz de degradar H₂O₂ liberando O₂ no meio. No entanto, esta metodologia apresenta certa limitação, tendo em vista que a capacidade de gerar O₂ pela reação do composto com H₂O₂, requer um alto controle de pH e temperatura, e desta forma, o sistema necessita ser totalmente vedado para que não haja entrada de O₂ no sistema e consequentemente a geração de um resultado falso-positivo. Os resultados obtidos neste estudo a respeito das atividades Sod e Cat *in vitro* de C1 e C4, os dois únicos já descritos por outros pesquisadores, corroboram os dados observados por Morcelli, 2016 e Melo, 2012 em diferentes ensaios *in vitro*, e confirmam a hipótese de que estes complexos apresentam somente potencial antioxidante mimético a Sod, assim como os compostos inéditos (C2, C3, C5 – C7).

Estes resultados, da atividade Sod e Cat *in vitro* obtidos, nortearam os próximos passos do trabalho, nos levando a explorar a capacidade Sod mimética de todos os compostos *in vivo*, utilizando o modelo de estudo, *S. cerevisiae*.

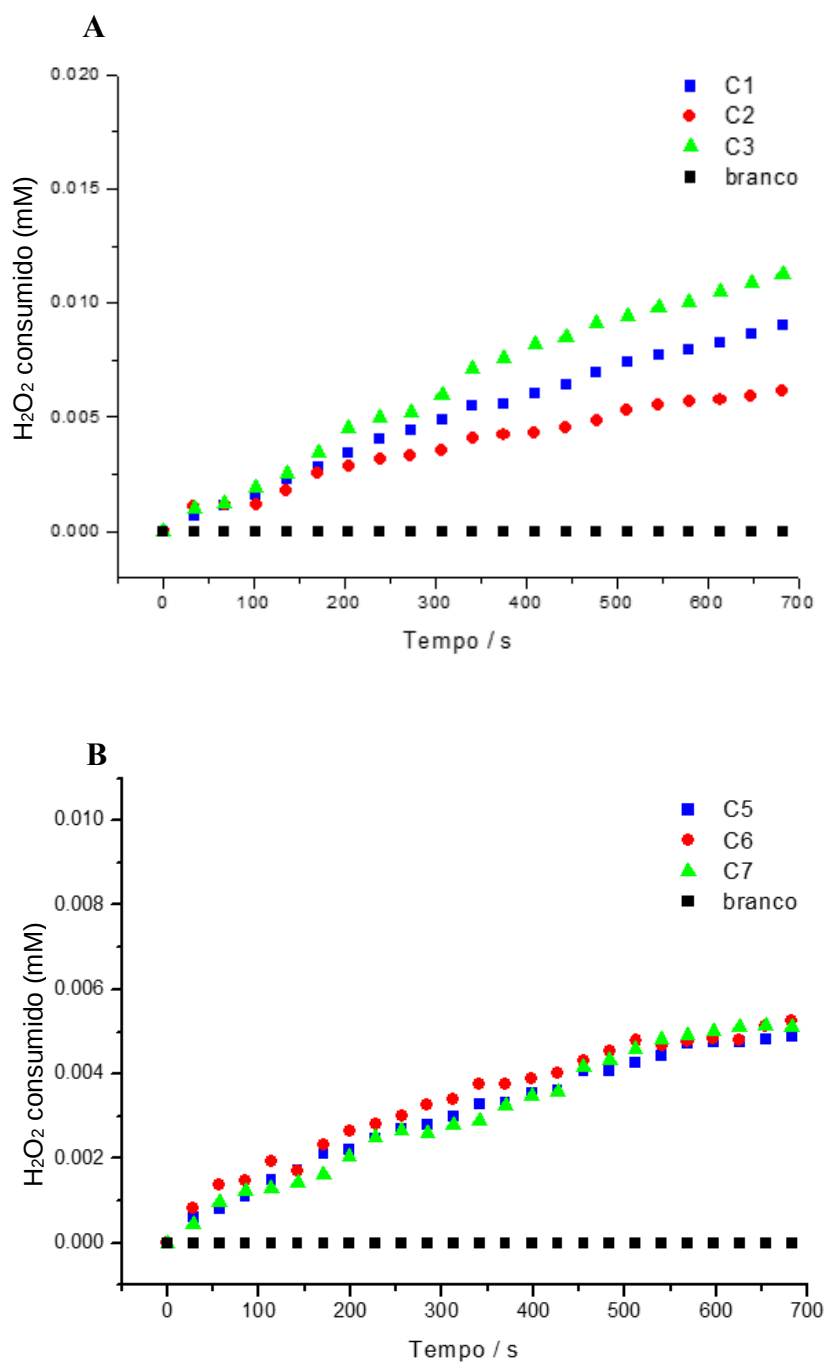


Figura 11. Consumo de H_2O_2 na presença e ausência dos compostos tanto da série A quanto da série B ($0,2 \mu\text{M}$). O consumo de H_2O_2 foi avaliado, em meio tamponado e em função do tempo de reação na presença e ausência dos compostos da série A (**A**) e da série B (**B**). Os resultados foram expressos através da taxa de consumo de peróxido de hidrogênio em mM/segundo.

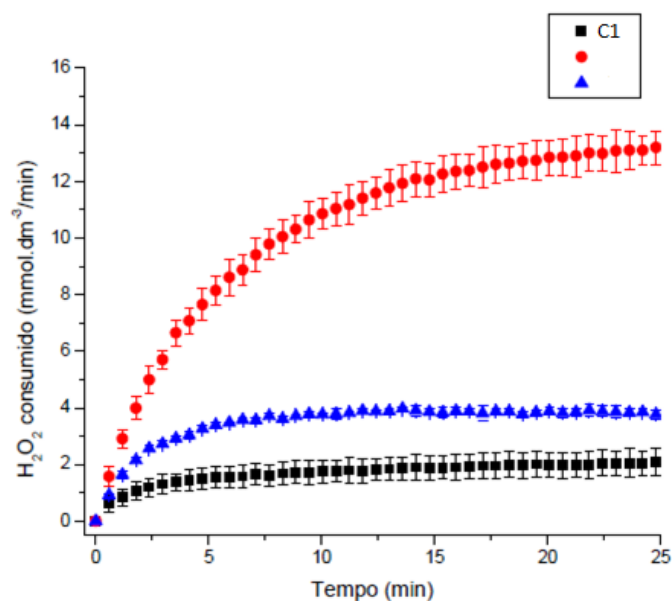


Figura 12. Consumo de H_2O_2 na presença e ausência de compostos de coordenação. O consumo de H_2O_2 foi avaliado, em meio tamponado e em função do tempo de reação na presença e ausência dos compostos C1 (■), $Fe(\alpha)$ naftolHBPA (●) e $Fe(\beta)$ naftolHBPA (▲) ($0,2 \mu M$). Os resultados foram expressos através da taxa de consumo de peróxido de hidrogênio em mM/segundo (adaptado de Morcelli, S. R., 2016).

5.2. Determinação dos níveis de sobrevivência das células expostas ao estresse oxidativo após o tratamento com os compostos Sod miméticos

5.2.1 Avaliação do efeito protetor dos compostos de coordenação em uma cepa selvagem de *S. cerevisiae*

As células da levedura *S. cerevisiae*, quando expostas a altas concentrações de glicose, sofrem com o fenômeno da repressão catabólica. Este fenômeno promove a repressão da transcrição de diversos genes, favorecendo a fermentação da glicose e acelerando o crescimento celular. Dentre os genes, cuja expressão é reprimida, estão aqueles ligados ao funcionamento mitocondrial e, conseqüentemente, ao metabolismo respiratório (Denoth Lippuner, Julou & Barral, 2014; Mirisola, Braun & Petranovic, 2013; Ruckenstein, Carmona-Gutierrez & Madeo, 2010). Na fase exponencial, as células de *S. cerevisiae* estão em metabolismo fermentativo, onde a produção das EROs é baixa e a maior parte das enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo não estão sendo sintetizadas. Portanto, por não apresentarem um sistema antioxidante totalmente ativo, e conseqüentemente com menor interferência do sistema antioxidante, o estudo da proteção celular promovida pelos compostos se torna mais eficaz.

Horn e colaboradores (2010), ao avaliar a citotoxicidade do composto C1 na cepa BY4741 de *S. cerevisiae*, nas concentrações de 10 – 500 μM , não observou susceptibilidade das células após 1h de tratamento (Horn Jr, *et al.*, 2010; Ribeiro, T. P., 2011). Este resultado também foi observado por Melo, K.V., 2012 ao avaliar a citotoxicidade dos compostos C1 e C4 na cepa selvagem de *S. cerevisiae*, BY4741, observou que ambos não apresentaram elevada citotoxicidade para este modelo de estudo. Enquanto que o composto C4 apresentou certa citotoxicidade a partir da concentração de 500 μM , apresentando 70% de sobrevivência após 1 h de exposição, o composto C1 não apresentou atividade citotóxica na faixa de concentração testada (10 – 500 μM).

Diante dos resultados obtidos por Melo, K.V., 2012 e Ribeiro T. P., 2011, bem como os resultados de atividade Sod mimética aqui demonstrados, decidimos investigar o efeito antioxidante dos 7 compostos de coordenação miméticos a Sod, todos contendo o metal de transição Fe em seu estado de oxidação 3^+ . Após o cultivo em metabolismo fermentativo, metade da primeira fase exponencial do crescimento celular em glicose, as células da cepa controle, EG103, foram tratadas com diferentes concentrações (1,5 - 25,0 μM) de cada um dos compostos de coordenação, durante 1 hora, e em seguida lavadas e submetidas ao estresse com 20,0 mM de menadiona, também por uma hora. Esse

screening foi realizado a fim de avaliar se os compostos seriam capazes de proteger as células contra o estresse oxidativo e se tal proteção teria caráter dose-dependente. A menadiona foi utilizada como agente estressor, tendo em vista que é uma fonte geradora de radical $O_2^{\bullet-}$. Cabe ressaltar que o *screening* foi realizado somente com a menadiona, uma vez que todos os compostos (C1 – C7) não apresentaram atividade *in vitro* Cat mimética, e, portanto, não utilizamos o H_2O_2 como agente estressor.

Como é possível observar nas figuras 13 e 14, as células que foram diretamente expostas à menadiona apresentaram uma acentuada queda nos níveis de sobrevivência. Tal efeito pode ser observado na cepa selvagem EG103, a qual mostrou 45% de sobrevivência após o estresse causado pela menadiona. Por outro lado, todos os compostos da série A foram capazes de proteger as células do estresse oxidativo provocado pela menadiona. Concentrações na faixa de 1,5 a 12,5 μM do C1 foram capazes de resgatar a sobrevivência em torno de 75%, não mostrando diferenças significativas entre elas. Com relação ao tratamento com a concentração de 25 μM , C1 apresentou uma maior capacidade de proteção, atingindo 100% de sobrevivência (Figura 13). Em relação ao C2, a menor concentração de tratamento foi capaz de resgatar cerca de 70% da sobrevivência celular após o estresse oxidativo, se mostrando significativamente diferente dos tratamentos na faixa entre 3,125 a 25,0 μM , que apresentaram cerca 95% de sobrevivência celular. O tratamento com o C3 foi capaz de dobrar a sobrevivência das células após o estresse com menadiona, não mostrando diferenças entre as concentrações testadas. O último composto da série A, o C4, por mais que aparente um caráter dose-dependente, não segue esse característica, pois as concentrações de 1,5 e 3,125 μM resgataram 70%, aproximadamente, da sobrevivência, enquanto que as maiores concentrações (6,25 – 25,0 μM) protegeram as células, atingindo um nível de aproximadamente 90% (Figura 13).

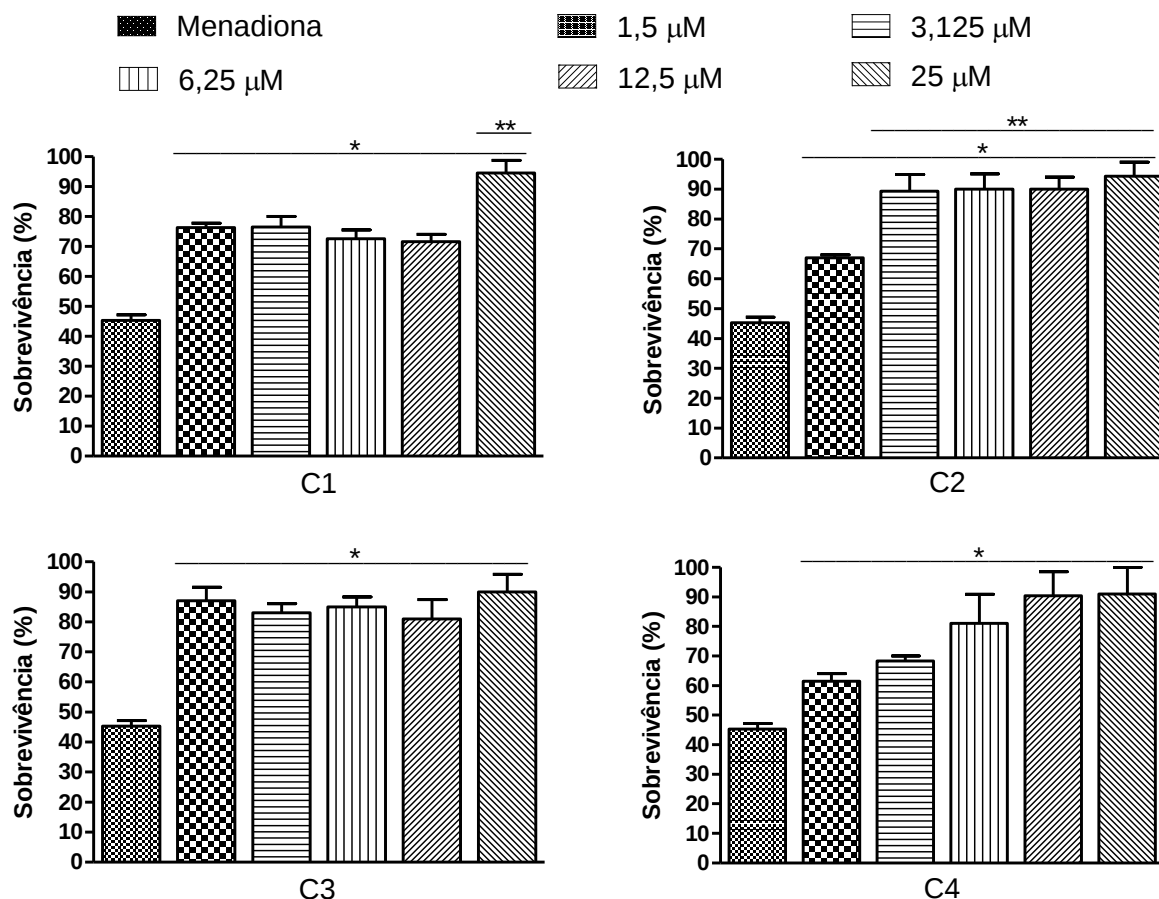


Figura 13. Efeito dos compostos miméticos a Sod na sobrevivência contra o estresse oxidativo. Células da cepa selvagem EG103 de *S. cerevisiae* foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos miméticos da série A. As células, tratadas ou não com os compostos, foram submetidas a condições de estresse oxidativo (menadiona 20,0 mM). Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência, obtidos através de uma relação entre as células estressadas e o controle (células não estressadas). Os resultados representam uma média de três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão. * representa resultados significativamente diferentes em relação ao controle positivo (menadiona), ** representa resultados significativamente diferentes da maior concentração de C1 em relação as menores concentrações e da menor concentração de C2 em relação as maiores concentrações. P valor < 0,05.

Na figura 14, podemos observar a capacidade de proteção dos compostos da série B após o estresse com a menadiona. Todos os compostos, em suas diferentes concentrações, com exceção da menor concentração do composto C6, foram capazes de resgatar aproximadamente 90% da sobrevivência celular após o estresse com menadiona.

Cabe ressaltar que nenhum dos compostos estudados exibiu efeitos tóxicos, no modelo utilizado, mesmo quando concentrações elevadas foram testadas. Essa característica permite a sua utilização, em faixas de concentração muito mais amplas do que os compostos ferroporfirina, por exemplo, que exibem níveis de toxicidade elevados, mesmo em concentrações baixas, a partir de 1,0 μM (Batinić-Haberle *et al.*, 2010; Kupersmidt *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2015).

Esses resultados, tanto da série A quanto da série B, nos mostram que esses compostos são capazes de proteger a levedura *S. cerevisiae* do radical superóxido gerado pelo estresse com a menadiona, e que todos os compostos na maior concentração testada (25 μM), protegeram as células atingindo níveis bastante elevados, entre 90 e 100% de sobrevivência. Diante desse fato, optamos por utilizar essa concentração de tratamento para os experimentos subsequentes.

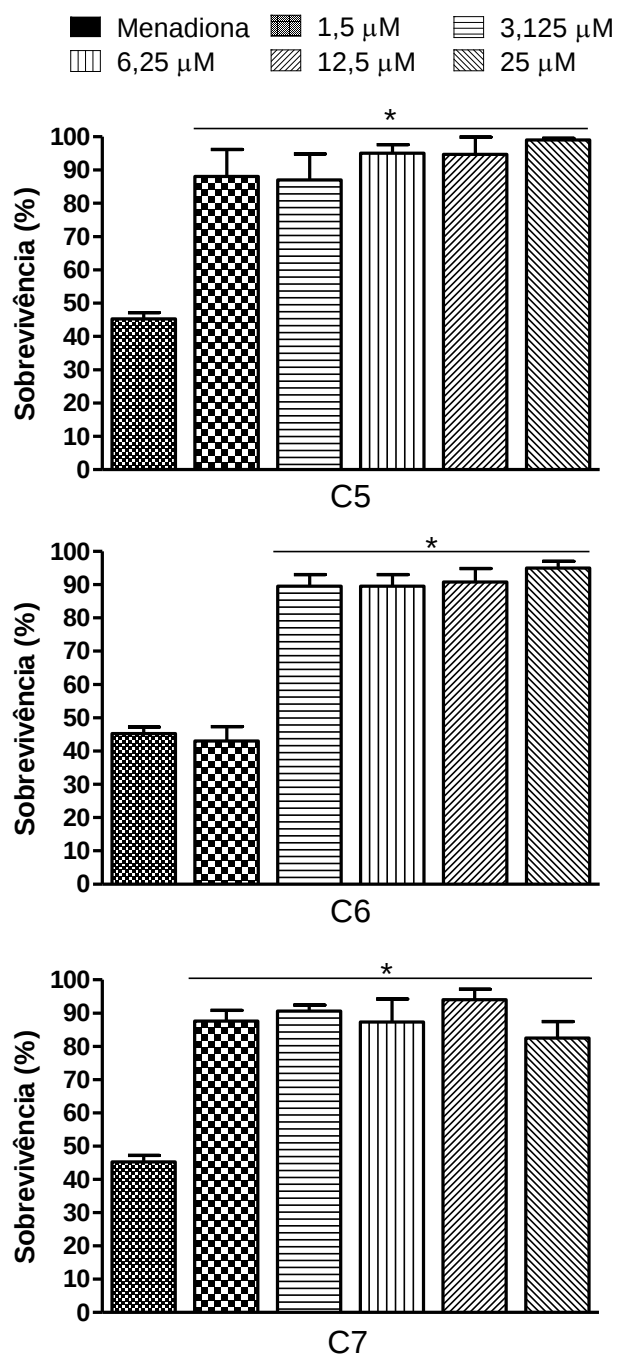


Figura 14. Sobrevivência ao estresse oxidativo na cepa EG103 de *S. cerevisiae* tratadas com diferentes concentrações dos compostos miméticos da série B. As células foram submetidas a condições de estresse com menadiona (20,0 mM) antes e após os tratamentos com os compostos de coordenação. Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência, obtidos através de uma relação entre as células estressadas e o controle (células não estressadas). Os resultados representam uma média de três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão. * representa resultados significativamente diferentes em relação ao controle positivo. P valor < 0,05.

5.3. Avaliação do efeito protetor dos compostos de coordenação em uma cepa deficiente na enzima Cu/Zn-superóxido dismutase (Sod1)

Enquanto que Melo, K.V., 2012 se deteve em estudar apenas o efeito protetor do C1 na cepa BY4741 exposta ao estresse oxidativo, Ribeiro e col. (2015) demonstraram a atividade antioxidante deste composto em duas cepas selvagens (BY4741) e mutante no gene *SOD1*, deficiente na síntese da enzima Sod1. A capacidade de proteção foi investigada em células diretamente estressadas com menadiona, as quais obtiveram valores de sobrevivência inferiores a 20%. Por outro lado, após tratamento com C1, as células apresentaram sua sobrevivência aumentada (Ribeiro, *et al.*, 2015). A cepa BY4741, exposta ao estresse com menadiona e tratada com C1, obteve um aumento de 70% em sua sobrevivência. A deficiência da enzima Sod1 acarretou no aumento da sensibilidade ao estresse com o $O_2^{\cdot-}$. A cepa mutante *sod1Δ*, sem tratamento não foi capaz de sobreviver ao estresse com menadiona, demonstrando a alta sensibilidade dessas células ao estresse provocado pela geração do $O_2^{\cdot-}$. Por outro lado, as células tratadas com C1 apresentou um aumento da sobrevivência de aproximadamente 60% (Ribeiro, *et al.*, 2015). Além disso, Ribeiro e col., 2015 também demonstraram que C1 reduziu a peroxidação lipídica, frente ao estresse com menadiona apresentando níveis de MDA semelhantes ao da célula não estressada (condição controle). Com base neste amplo estudo os autores acreditam que este composto atua como mimético a Sod removendo o excesso de $O_2^{\cdot-}$ devido a sua intrínseca atividade mimética (Ribeiro, *et al.*, 2015; Ribeiro, *et al.*, 2017).

Neste trabalho, a importância do sistema antioxidante na resposta contra o estresse oxidativo, é evidenciado quando analisamos o comportamento da cepa mutante EG118 (*sod1Δ*) na resposta ao estresse oxidativo. Podemos observar na figura 15 que após o estresse direto causado pela menadiona, os níveis de sobrevivência da mutante *sod1Δ* são nulos, indicando uma hipersensibilidade causada pela ausência da enzima Sod1. Com isso, ao comparar o perfil de sobrevivência entre a cepa selvagem EG103 e a mutante *sod1Δ*, EG118, sob condições de estresse oxidativo, podemos sugerir que a sobrevivência observada na cepa selvagem, sob a mesma condição de estresse, pode estar relacionada a presença da enzima Sod1.

Como descrito no subitem 5.2.1 o tratamento com os compostos miméticos da série A como da série B foram capazes de resgatar a sobrevivência celular após o estresse oxidativo severo (Figura 15). Em relação aos compostos da série A, podemos observar

que os tratamentos com os compostos, foram responsáveis por restaurar 100% da sobrevivência na cepa selvagem, em contraste com os baixos níveis de sobrevivência observado pelas células diretamente expostas ao estresse com menadiona, onde apresentarem 45% de sobrevivência (Figura 15, letra A). Um perfil muito parecido pode ser observado com os compostos da série B (Figura 15, letra B).

Com relação a cepa *sod1Δ*, o C3 foi o mais eficaz, promovendo um aumento significativo da sobrevivência celular, onde elevou para 70% o índice de células viáveis. Porém, os tratamentos com C1 e C4 foram menos eficazes, apresentando níveis de proteção de 15% e 20%, respectivamente. Apesar da baixa proteção conferida por C1 e C4, quando comparamos a sobrevivência das células tratadas com estes compostos e as células sem tratamento, podemos observar que ambos promoveram um aumento significativo dos níveis de sobrevivência. Quanto ao C2, este não promoveu proteção celular, mostrando resultados iguais ao controle positivo (Figura 15, letra A). O tratamento com os compostos da série B também foram capazes de proteger as células da mutante *sod1Δ*. O tratamento com o C6 foi o menos eficaz, gerando os menores níveis de proteção, quando comparado com C5 e C7, onde os níveis de viabilidade aumentaram em torno de 70% e 65%, respectivamente (Figura 15, letra B). Considerando que para a *sod1Δ*, diretamente estressada, os níveis de sobrevivência foram nulos, o efeito mais discreto dos C1, C4 e C6 ainda pode ser considerado um efeito protetor, pois aumentaram significativamente a sobrevivência celular.

Os resultados sobre a capacidade de proteção celular promovida pelos compostos, nos mostram de uma forma geral que todos os compostos de coordenação testados, com exceção do C2, atuam como compostos protetores, porém somente os compostos (C3, C5 e C7) foram mais eficazes na proteção da mutante *sod1Δ* ao estresse oxidativo severo, podendo ser considerados excelentes compostos miméticos a Sod. Este resultado está de acordo com o resultado da atividade de superóxido dismutase *in vitro*, o qual mostrou que tais compostos têm atividade Sod mimética *in vitro*, sendo que os compostos C3, C5 e C7 foram os que mais protegeram as células *S. cerevisiae* deficiente na expressão da Sod1.

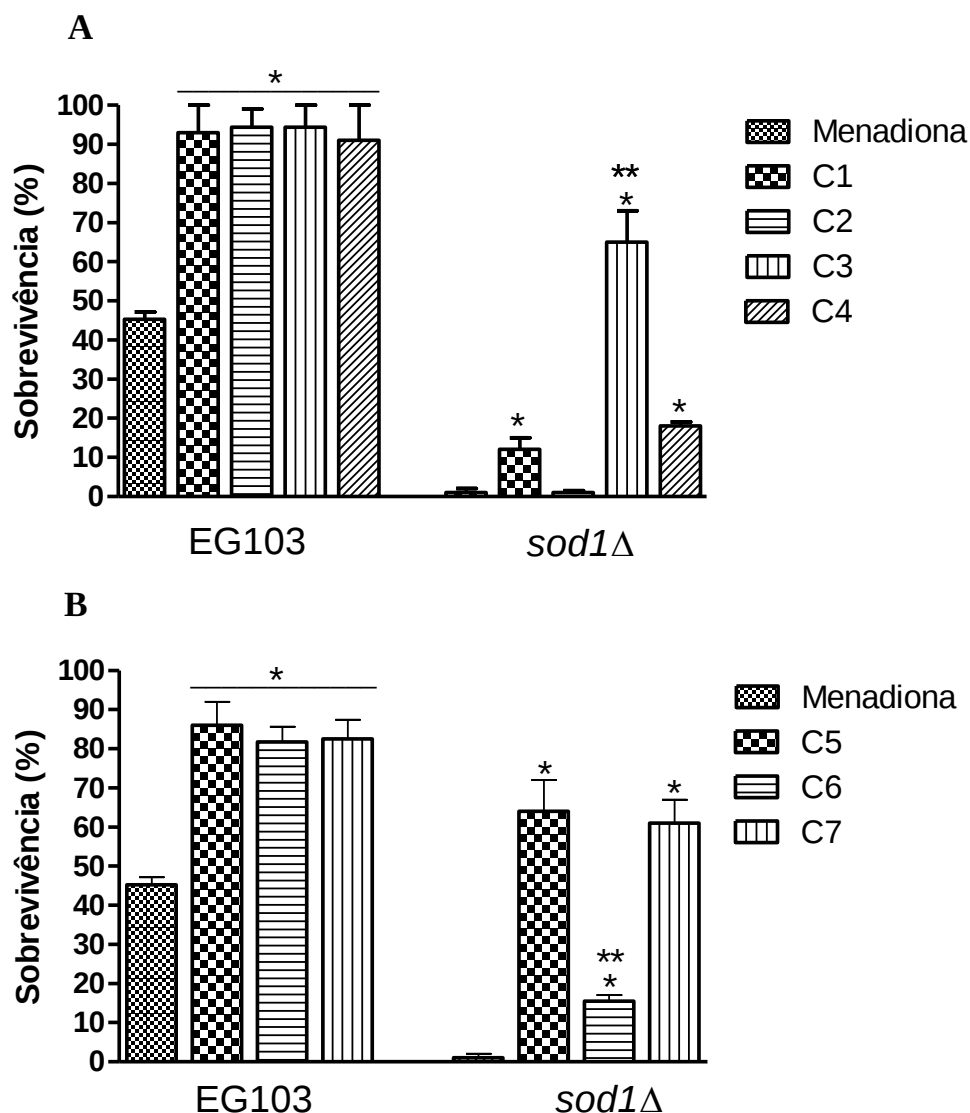


Figura 15. Sobrevivência ao estresse oxidativo na mutante de *S. cerevisiae* *sod1Δ* tratadas com os compostos miméticos. As células foram submetidas a condições de estresse com Menadiona (20,0 mM) antes e após o tratamento de 25 μ M com os compostos de coordenação. **(A)**. Representa os resultados obtidos com os compostos da série A e **(B)**. Representa os resultados com os compostos da série B. Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência, obtidos através de uma relação entre as células estressadas e o controle (células não estressadas). Os resultados representam uma média de três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão. * representa resultados significativamente diferentes em relação ao controle positivo, ** representa resultados significativamente diferentes do C3 em relação aos outros da série A e do C6 em relação aos outros da série B. P valor < 0,05.

Alguns questionamentos podem surgir durante a análise destes resultados. Seriam os compostos realmente eficazes na proteção de *S. cerevisiae*? Seria possível que apenas o sal metálico, empregado na sua síntese, fosse capaz de conferir proteção às células? Ou ainda, se mesmo o ligante, coordenado ao íon metálico, poderia, isoladamente, ser o responsável por promover o aumento da sobrevivência? Para que pudesse ser esclarecido de que forma as células de *S. cerevisiae* estão se tornando mais resistentes à uma condição de estresse oxidativo, Ribeiro, T. P (2011) em sua dissertação de Mestrado, demonstrou que o C1, apresenta altos índices de atividade antioxidante *in vivo* e que o tratamento com íons Fe^{3+} ou ligante de C1 na concentração de 25 μM não foi capaz de proteger as células contra o estresse oxidativo. Estas informações sugerem que C1 possui uma grande estabilidade, indicando que o mesmo é capaz de manter sua integridade no meio intracelular promovendo a proteção requerida pelas células (Ribeiro, et al., 2017; Ribeiro *et al.*, 2015). Devido a semelhança dos compostos empregados neste estudo, acreditamos que todos eles tenham a mesma estabilidade que o C1.

Por outro lado, caso ocorresse a dissociação dos compostos no ambiente intracelular, seria possível observar efeitos oxidantes ainda mais severos, que resultariam, diretamente, em menores índices de sobrevivência celular. Nesse cenário, uma possível dissociação do composto, causaria a liberação do ferro presente na sua estrutura podendo produzir mais EROs no meio intracelular. Tais reações entre metais e EROs levaria a geração, por exemplo, dos radicais hidroxila, altamente reativos, contribuindo para o aumento dos níveis de estresse oxidativo, e também para a geração de danos severos a proteínas, lipídios e DNA (Costa & Moradas-Ferreira, 2001; Jomova & Valko, 2011). Sabe-se que os íons Fe^{2+} e Cu^{2+} , uma vez livres no meio intracelular, podem participar das reações de Fenton e Haber-Weiss. Já foi demonstrado, por exemplo, que compostos porfirínicos de Fe ou Cu demonstram alto potencial citotóxico, devido à grande eficiência de gerarem radicais $\text{HO}\cdot$ (Batinić-Haberle *et al.*, 2010; Kupersmidt *et al.*, 2010). Esse efeito ocorre, principalmente, por conta da instabilidade desses compostos que, uma vez em solução, são facilmente dissociados, liberando os íons, promovendo efeitos pró-oxidantes (Miriyyala *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2015). Portanto, o grande desafio, além de sintetizar compostos com propriedades antioxidantes, está em desenvolver um ligante capaz de evitar a dissociação do metal, mantendo assim as propriedades antioxidantes, e minimizando possíveis efeitos tóxicos.

5.4. Avaliação da capacidade dos compostos em reduzir a disfunção mitocondrial

O estresse oxidativo promove danos diretos e indiretos aos lipídios, proteínas e DNA. O acúmulo dos danos, causados pelo ataque das EROs, à essas biomoléculas resultam, inevitavelmente, na morte celular por necrose ou por apoptose (Ruckenstuhl, Carmona-Gutierrez e Madeo, 2010). Novas teorias continuam a surgir baseando-se em importantes aspectos das teorias antecessoras, como por exemplo, a “Teoria Mitocondrial” que consiste em um aumento na produção de EROs, acúmulo de danos no DNA mitocondrial, e disfunção progressiva da cadeia transportadora de elétrons (Dufour & Larsson, 2004, Alexeyev *et al.*, 2004). Desta forma, a disfunção mitocondrial tem demonstrado relação estreita com o estresse oxidativo. A mitocôndria, como se é conhecido, é responsável pelo processo de respiração celular, através do qual se produz a energia necessária para viabilizar inúmeras reações essenciais ao funcionamento das células (Jomova *et al.*, 2010; Perfeito *et al.*, 2013). Além disso, a mitocôndria tem participação em outros processos celulares importantes, tais como a resposta ao estresse e a vias de morte celular (Dryanovski *et al.*, 2013).

Com o intuito de avaliar o efeito dos compostos a nível de proteção do material genético, foi realizada a análise de disfunção mitocondrial que tem por objetivo avaliar a incapacidade das células de desenvolverem as mitocôndrias quando crescidas em meio contendo uma fonte de carbono não repressora como fonte de energia, neste trabalho, glicerol, onde apresentam metabolismo respiratório. Estas células recebem o nome de “*petites*”. Neste meio as células que apresentarem mitocôndrias não funcionais, devido a uma provável alteração no DNA mitocondrial e/ou nuclear, se tornam incapazes de formar colônia em meio sólido YPGly 4%. Como a *sod1Δ* foi hipersensível ao estresse com menadiona (<1% de sobrevivência), não realizamos este teste de disfunção mitocondrial nesta cepa.

Apesar da maior resistência encontrada na cepa EG103 em metabolismo fermentativo, podemos observar índices consideráveis de disfunção mitocondrial, expressos em porcentagem de células funcionais (barras cinzas) e *petites* (barras brancas) entre as células viáveis, após estresse causado pela menadiona (Figura 16). A disfunção mitocondrial encontrada nesta cepa pode ser relacionada com a capacidade de geração de radical superóxido gerada quando as células em metabolismo fermentativo foram submetidas ao agente estressor.

Como pode ser visto na figura 16, após o estresse com menadiona 20 mM, 13% dos 45% de células viáveis apresentaram algum problema na respiração. Porém quando essas células foram submetidas ao tratamento com os diferentes compostos, podemos observar que esse cenário não se repetiu, com exceção do composto C2, que apresenta 2% de células danificadas do total de 100% de células funcionais, os outros compostos foram bastante eficazes em reverter este cenário.

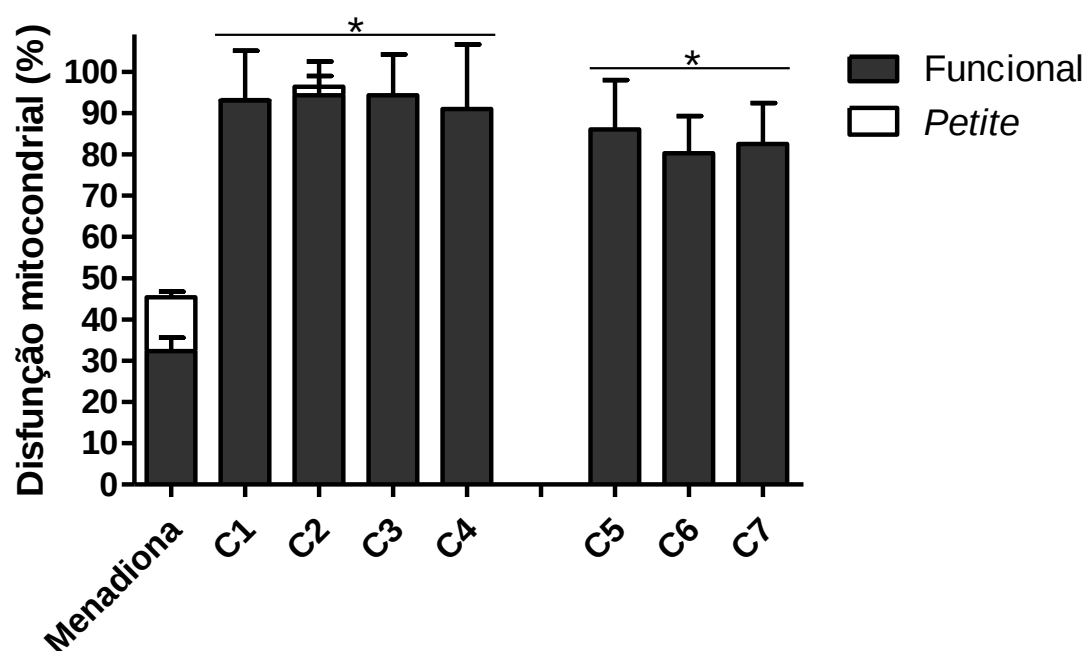


Figura 16. Efeito do tratamento com os compostos na disfunção mitocondrial em células selvagens de *S. cerevisiae*. As células foram submetidas a condições de estresse com menadiona (20,0 mM) antes e após os tratamentos com os compostos. Os resultados são expressos em porcentagem de células funcionais (barras cinzas) e *petites* (barras brancas) entre as células viáveis. A determinação da indução de *petite* foi expressa em porcentagem da razão entre o número de colônias obtidas em YPD2% subtraído do crescimento de colônias em YPGly4% dividido pelo total de colônias em YPD2% para cada tratamento com composto. Os resultados representam uma média de três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão. *p valor < 0,05.

5.5. Avaliação da indução da resposta celular após tratamentos com os compostos miméticos

A regulação transcricional de fatores relacionados ao estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na resposta adaptativa às condições de estresse (ex. estresse oxidativo). O controle da homeostase redox celular é fortemente dependente da ativação de fatores de transcrição, tais como Yap1, Hsf1, Msn2 e Msn4. Todos estes fatores são ativados somente em condições de estresse e estão envolvidos na regulação da expressão de genes envolvidos na proteção celular (Ribeiro, *et al.*, 2015).

Após demonstrar, *in vitro* e *in vivo*, a atividade antioxidante dos compostos de coordenação, algumas questões podem surgir acerca dos possíveis mecanismos de ação destes compostos. Embora os resultados indiquem que a atividade Sod mimética, intrínseca dos compostos, seja a responsável pela proteção observada *in vivo*, é preciso considerar outras possibilidades. Muitos estudos descrevem as dificuldades em torno da análise dos efeitos de compostos de coordenação (Batinić-Haberle *et al.*, 2010; Miriyala *et al.*, 2012). Alguns fatores podem influenciar os efeitos observados *in vivo*, dentre os quais podemos destacar a ativação da resposta celular, sob determinadas condições de estresse (Keaney *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2013).

Com o intuito de esclarecer tais pontos, decidimos investigar a capacidade dos compostos em ativar uma resposta celular dependente de certos fatores de transcrição responsáveis pela indução da resposta ao estresse. Assim, através do uso de células deficientes no fator de transcrição Yap1 (*yap1Δ*), da indução da expressão da proteína Hsp104 e da determinação da atividade de enzimas endógenas antioxidantes, tais como Sod e Cat, nosso trabalho tentou compreender como os compostos estão protegendo as células; se a proteção observada seria em decorrência da indução de uma resposta celular ou se a mesma ocorre por conta da atividade intrínseca dos compostos. Nesta seção, somente os compostos mais eficazes na proteção das cepas selvagem e mutante *sod1Δ* foram utilizados.

5.5.1 Contribuição do fator de transcrição Yap1 para a resposta das células tratadas com os compostos miméticos

Em *S. cerevisiae*, o fator transcricional Yap1, que é ortólogo ao fator AP-1 de mamíferos, regula a expressão de um subconjunto de genes, associados a resposta celular contra o estresse oxidativo (Menezes *et al.*, 2008). Yap1 desempenha um papel central na resposta ao estresse, sendo o maior regulador da defesa antioxidante em leveduras (Pimentel, *et al.*, 2014). Sabe-se que o aumento nas concentrações de H₂O₂, por exemplo, promove a ativação de Yap1, modulando a resposta antioxidante (Menezes *et al.*, 2008). Por outro lado, a deficiência de Yap1 faz com que as células sejam hipersensíveis ao estresse oxidativo. Esta sensibilidade é devida a necessidade da presença de Yap1 para indução da expressão de diversos genes de proteção antioxidante, tais como *TRX1*, que codifica a Tiorredoxina; *TRR1*, que codifica a Tiorredoxina redutase; *GLR1*, Glutathione Oxidorredutase; e *GSH1*, que codifica o tripetídeo GSH e a própria *SOD1*, que codifica a Cu/Zn Superóxido dismutase (Jomova e Valko, 2011). Nesse contexto, empregando uma cepa mutante, *yap1Δ*, deficiente na síntese do fator de transcrição Yap1, investigamos se os compostos Sod miméticos C3, C5 e C7 continuariam a proteger as células de *S. cerevisiae* hipersensíveis ao estresse oxidativo. A hipersensibilidade da cepa *yap1Δ* ao estresse com menadiona confirma o papel crítico que Yap1 desempenha na proteção contra condições de estresse oxidativo (Figura 17). Por outro lado, mesmo na ausência de Yap1 e, portanto, incapacidade de ativar a resposta ao estresse oxidativo, os compostos C3, C5 e C7 foram capazes de induzir uma forte aquisição de tolerância ao estresse oxidativo (Figura 17). Novamente, os resultados obtidos não apenas reforçam a atividade antioxidante protetora dos compostos, mas também demonstram que seus efeitos são independentes da ativação deste importante fator de resposta ao estresse oxidativo.

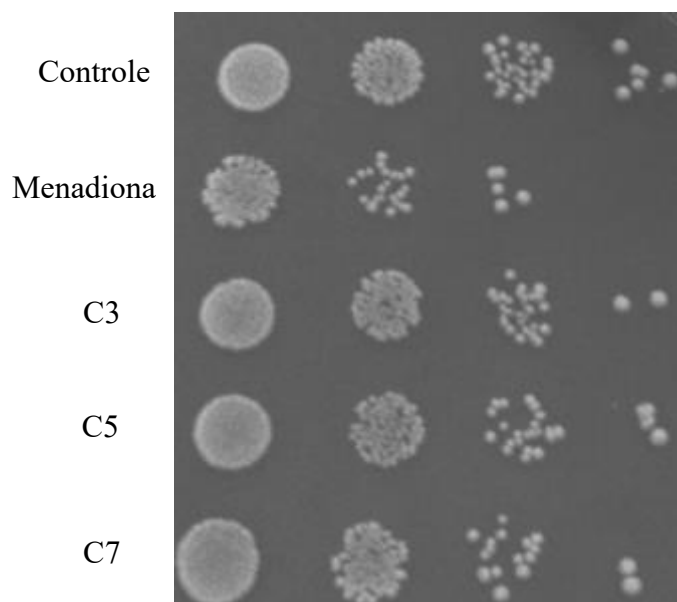


Figura 17. Efeito dos compostos de coordenação em *S. cerevisiae* deficiente na expressão de Yap1. As células foram crescidas em meio contendo glicose (YPD2%), até a metade da primeira fase exponencial de crescimento. Após foram submetidas ao tratamento com os compostos de coordenação C3, C5 e C7 por 1 hora, em seguida, expostas ao estresse com 20 mM de menadiona por 1 hora. Além disso células sem tratamentos foram expostas diretamente ao estresse com 20 mM de menadiona. Em seguida, foram feitas diferentes diluições, das quais alíquotas de 5,0 μ L foram plaqueadas em meio contendo glicose.

5.5.2. Indução da expressão e ativação da proteína Hsp104 após tratamento das células com os compostos miméticos

As proteínas de choque térmico, cuja síntese é mediada pela ativação de Hsf1, exercem um papel essencial na manutenção de estruturas proteicas, reparando lesões estruturais, mantendo a atividade das proteínas, e evitando também a formação de agregados proteicos (Morano, K. A., Grant, C. M & Moye-Rowley, W. S., 2012). O Hsf1 faz parte de uma família de fatores de transcrição, altamente conservados, e que são críticos para a resposta ao choque térmico, em organismos eucariotos. O Hsf1 fica localizado no núcleo, e apresenta baixo nível de atividade transcricional constitutiva (Calderwood, *et al*, 2009). No entanto, basta as células serem submetidas a um tratamento térmico a 40°C por 1h para que o Hsf1 seja ativado e, desta forma reprogramar o funcionamento celular, promovendo tolerância térmica (Morano, K. A., Grant, C. M & Moye-Rowley, W. S., 2012; Pereira, Eleutherio e Panek, 2001).

Embora originalmente descobertas como proteínas de choque térmico, muitas chaperonas moleculares também têm funções de manutenção do ambiente intracelular e são essenciais para a homeostase celular mesmo à temperatura fisiológica (Walter & Buchner, 2002). Assim, um nível de expressão basal adequado destas chaperonas é importante em condições normais de crescimento. Quando expostas ao estresse, as células necessitam de uma capacidade de chaperona aumentada devido a um aumento na quantidade de proteínas parcialmente desenoveladas, isto é, tem como função assegurar que os polipeptídeos sejam enovelados e compartimentalizados corretamente (Bösl, Grimminger & Walter, 2006).

Algumas HSPs apresentam sua síntese induzida em resposta a uma grande variedade de estresses, tais como o estresse térmico, osmótico, oxidativo entre outros (Morano, K. A., Grant, C. M & Moye-Rowley, W. S., 2012). Sabe-se que a Hsp104 desempenha um papel crucial na aquisição de tolerância ao estresse térmico. Em resumo, Hsp104 é uma chaperona anti-estresse geral que promove a desagregação de proteínas mal enoveladas causada pelo estresse (Glover & Lindquist, 1998). A função desta proteína é tamanha sendo possível visualizar agregados proteicos através da co-localização da Hsp104 após indução por choque térmico (Liu *et al.*, 2010, Zhou *et al.*, 2011).

Para determinar a indução da expressão da proteína Hsp104 após o tratamento com os compostos de coordenação C3, C5 e C7, utilizamos uma cepa que continha a

construção da proteína Hsp104 fusionada a proteína fluorescente GFP. Esta construção permitiu analisarmos através de microscopia de fluorescência a indução da expressão desta proteína após os tratamentos com os compostos Sod miméticos. Como esperado, na condição controle não foi observada nenhuma expressão da proteína Hsp104-GFP (Figura 18). Entretanto, quando as células foram submetidas ao tratamento térmico a 40°C observamos não somente o aumento da expressão de Hsp104-GFP no citoplasma, mas também a ativação desta proteína. É possível perceber *puncta* referentes a proteína Hsp104-GFP tentando desagregar aglomerados proteicos produzidos pelo aumento de temperatura (Figura 18). Com relação a expressão da Hsp104-GFP após os tratamentos com C3, C5 e C7, podemos observar que o tratamento com os compostos induziu claramente a expressão da proteína Hsp104, sugerindo que os mesmos induzem a expressão de proteínas de choque térmico em células de levedura (Figura 18). Todas os compostos apresentaram um comportamento similar quanto a indução da expressão da proteína Hsp104. Cabe ressaltar que C3, C5 e C7, apesar de induzir a expressão da Hsp104-GFP, não foram capazes de ativar esta proteína.

Contudo, após o tratamento com os compostos, os resultados mostraram que estes induziram a expressão da proteína Hsp104 confirmando assim que os compostos podem ativar o fator de transcrição Hsf1, demonstrando que seu mecanismo de ação pode ser através da indução da resposta celular mediada por Hsf1.

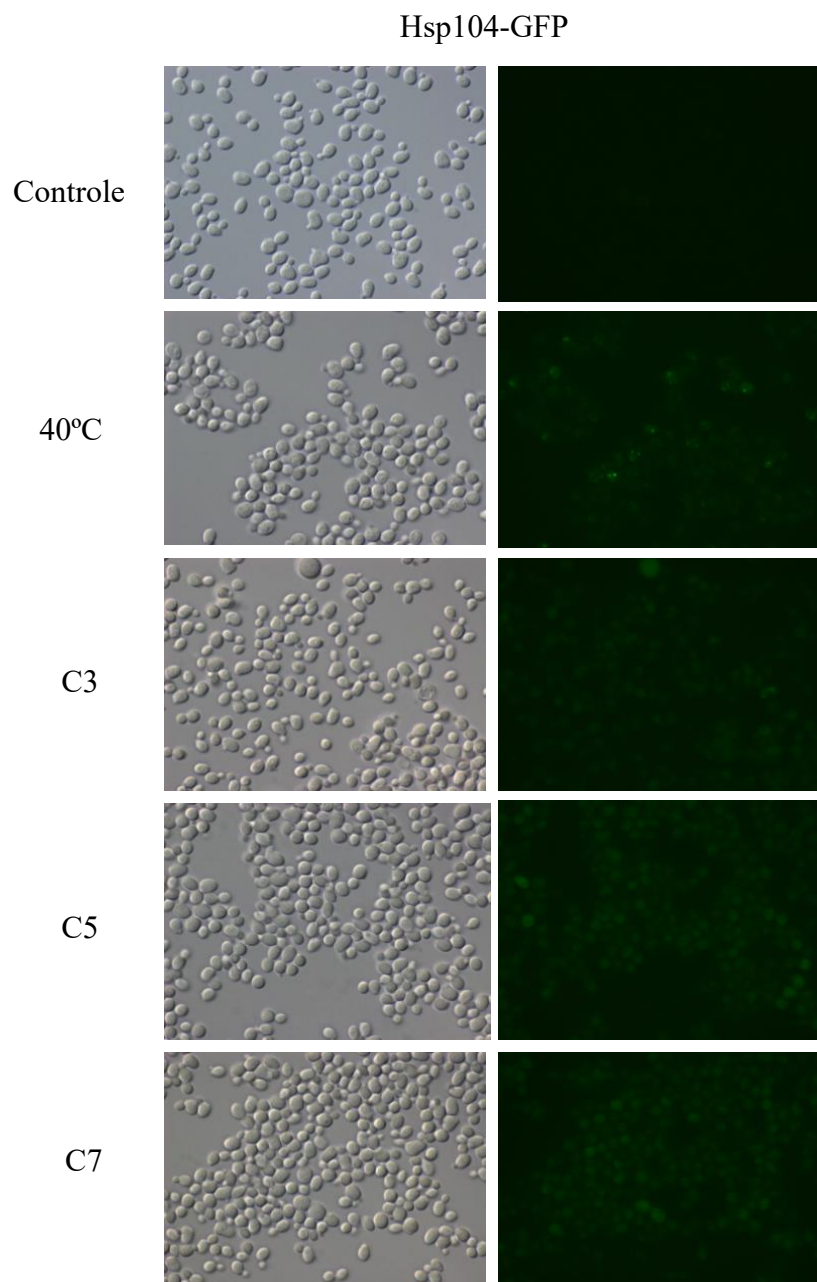


Figura 18. Indução da expressão da Hsp104-GFP. As células da proteína Hsp104 fusionada a proteína fluorescente GFP foram tratadas com os compostos C3, C5 e C7 por 1 hora ou submetidas ao choque térmico a 40°C por 1 h,. A fluorescência da Hsp104-GFP foi observada por microscopia de fluorescência. Os experimentos foram repetidos 2 vezes.

5.5.3 Avaliação da atividade endógena da Sod e Cat em células submetidas ao tratamento com os compostos miméticos.

Tendo em vista que os compostos se mostraram promissores através de sua atividade antioxidante, aumentando a resistência das células e promovendo altos níveis de sobrevivência após condições de estresse oxidativo, procurou-se investigar como estes compostos poderiam estar conferindo proteção às células. De fato, existe duas possibilidades para que tais compostos protejam as células. Apesar de alguns compostos de coordenação descritos na literatura apresentarem atividade Sod e/ou Cat miméticas *in vitro*, muitos destes compostos quando testados em modelos de estudo biológicos induzem uma resposta celular ao tratamento. Isto significa que ao serem absorvidos ativam cascatas de sinalização que resultarão em uma alteração da expressão gênica levando a síntese de novas proteínas/enzimas acarretando em uma adaptação e proteção celular. Por outro lado, existem compostos que são capazes de proteger as células devido a sua própria atividade catalítica Sod e Cat miméticas (Ribeiro, et al., 2017; Ribeiro *et al.*, 2015).

Neste contexto, optamos por investigar se o tratamento com os compostos de coordenação estaria aumentando a atividade das enzimas antioxidantes relacionadas com a resposta ao estresse oxidativo, as enzimas Sod e Cat. Embora a Sod seja encontrada em células crescendo exponencialmente em glicose, a enzima catalase é uma das enzimas antioxidantes que sofrem repressão catabólica e, por isso as células não apresentam atividade catalásica durante esta fase do crescimento. Portanto, ao investigar a atividade destas enzimas teremos mais informações sobre como os compostos podem ou não estar contribuindo para uma resposta celular ou atuando através de sua atividade catalítica.

Como podemos observar na figura 19A, após o tratamento com menadiona 0,5 mM, a cepa selvagem apresentou um aumento em torno de 2,0 vezes da atividade Sod. Nesta mesma figura, também observamos que o tratamento com os compostos foi capaz de provocar um aumento dos níveis de atividade Sod. No entanto, todos os compostos demonstraram níveis de ativação semelhantes, sem diferenças estatisticamente significativas entre eles.

Com relação a atividade da enzima catalase, podemos observar na figura 19B, que o tratamento com os compostos levou a um significativo aumento da atividade desta enzima. Como já esperado, não foi observado atividade catalase na condição controle, exibindo valores específicos de 0,3 U/mg de proteína. A atividade específica da enzima

catalase aumentou de 0,3 em condições normais de crescimento para 1,4 U/mg de proteína após o estresse brando com peróxido de hidrogênio. Com relação ao efeito do C3 na atividade catalase, foi possível observar um aumento significativo da atividade dessa enzima nas células tratadas, apresentando 4,6 U/mg de proteína. Por outro lado, o C5, apresentou valores da atividade catalásica ainda mais elevados após o tratamento, atingindo valores de 6,0 U/mg de proteína. Já o tratamento com C7, exibiu valores de 3,4 U/mg de proteína.

Contudo, é importante ressaltar, que ainda não há na literatura dados disponíveis que demonstrem a ação de compostos antioxidantes miméticos as enzimas superóxido dismutase e catalase, capazes de induzir a expressão de proteínas de choque térmico, bem como a Hsp104, e induzir a expressão de enzimas antioxidantes Sod e Cat. Basicamente, a grande maioria dos dados disponíveis, na literatura, demonstram a ação de compostos de coordenação *in vitro*, focando principalmente na degradação do peróxido de hidrogênio, e por vezes, também, na inibição da redução do NBT pelo $O_2^{\cdot-}$, pelo sistema xantina/xantina oxidase (Horn Jr. et al., 2010).

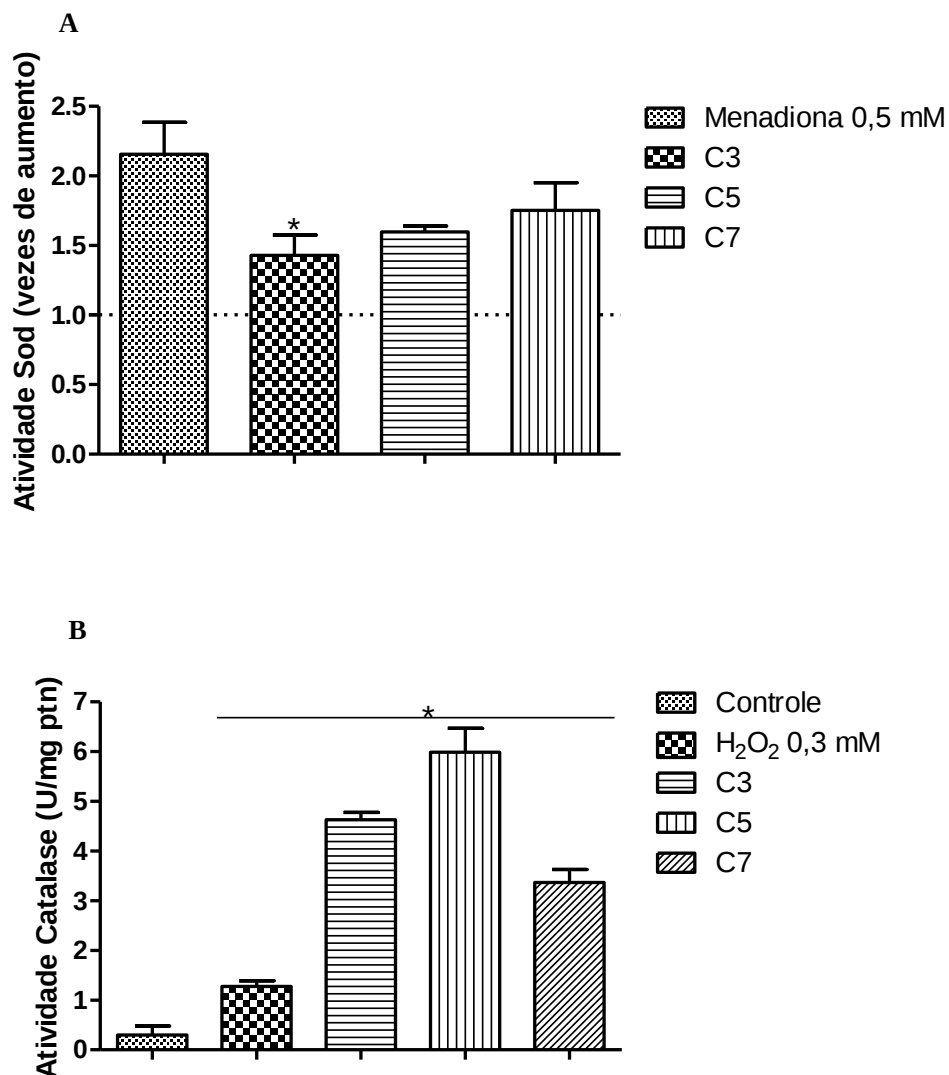


Figura 19. Ativação das enzimas Sod e Cat de *S. cerevisiae* após o tratamento com os compostos Sod miméticos. **A.** Atividade de superóxido dismutase. Células em crescimento exponencial foram submetidas ao estresse com menadiona (0,5 mM) ou ao tratamento com os compostos a 25 μ M. Os resultados estão representados pela razão da atividade de Sod entre as células tratadas com os diferentes compostos e a atividade da Sod na condição controle. **B.** Atividade de catalase. Células em crescimento exponencial foram submetidas ao estresse com H₂O₂ (0,3 mM) ou ao tratamento com os compostos a 25 μ M. Os resultados estão representados em U/mg de proteína, onde 1U corresponde ao consumo de 1 μ mol de H₂O₂/min, determinados por espectrofotometria a 240 nm. Os resultados representam a média e desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes. * p valor <0,05.

5.6. Determinação das concentrações intracelulares de metal

A fim de determinar os níveis de absorção dos compostos de coordenação, pelas células de *S. cerevisiae*, foram feitas, análises de Espectrometria de Massas Indutivamente Acoplada (ICP-MS), que permitem a determinação dos níveis intracelulares de metais. Estas análises foram conduzidas em colaboração com o Prof. Nicolás Ádrian Rey, do Instituto de Química da PUC-Rio. Considerando que os compostos são formados por um íon metálico (Fe^{3+}) complexado a um ligante orgânico, o ensaio teve o objetivo de comparar as concentrações intracelulares deste metal, antes e após o tratamento com os compostos de coordenação. Dessa forma, as alterações nas concentrações do metal, presentes em cada composto, indicariam os níveis de absorção para cada um deles.

Para tal propósito, as células foram tratadas com 25 μM de cada um dos compostos, durante 1 hora a 28°C, conforme descrito no subitem 4.4. Essa concentração foi escolhida a fim de manter uma condição padrão de tratamento. Logo após o tratamento com os compostos, as células foram então coletadas e preparadas para análise. Os resultados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação da quantidade de metal ferro no interior de células de *S. cerevisiae* tratadas com os compostos miméticos

Quantidade em ppm ($\mu\text{g/g}$ de célula)		
Condição	Antes do tratamento	Após 1h de tratamento
Controle	$61,95 \pm 4,15$	$61,95 \pm 4,15$
C3	$110,7 \pm 36,3$	$287,5 \pm 51,5$
C7	$94,25 \pm 2,95$	$945,0 \pm 53,0$
WT <i>S. cerevisiae</i>	$41,7 \pm 1,5$	—

As células de *S. cerevisiae* foram tratadas com $25 \mu\text{M}$ dos compostos ($28^\circ\text{C}/1\text{h}$), isoladamente, e em seguida preparadas para análises por ICP-MS. Células que não foram submetidas a tratamentos, com os compostos de coordenação, foram utilizadas como controle. A tabela também apresenta concentrações intracelulares padrões, descritos na literatura, para a levedura *S. cerevisiae*. Os resultados representam uma média de dois experimentos independentes $\pm$ desvio padrão.

Foi possível observar que os tratamentos com os compostos provocaram uma mudança significativa no perfil intracelular da concentração do metal Fe determinado no controle, sugerindo que as células são capazes de absorver esses compostos. Após o tratamento com os compostos C3 e C7, observou-se um aumento significativo nas concentrações intracelulares de Fe, o que sugere fortemente a absorção desse cátion, ou seja, do composto mimético pelas células. Cabe ressaltar que as concentrações de Fe, após o tratamento com os compostos contendo este metal, foram distintas. Contudo, o composto C7 foi o que provocou o maior aumento nas concentrações do metal Fe, presente na sua composição, indicando uma maior absorção.

6. CONCLUSÕES

- ❖ Todos os compostos da série A demonstraram *in vitro* alta capacidade Sod mimética. Por outro lado, dentre os compostos da série B, apenas os compostos C5 e C6 apresentaram moderada capacidade Sod mimética;
- ❖ Todos os compostos de coordenação testados foram capazes de promover proteção antioxidante contra o estresse oxidativo gerado pelo radical superóxido na cepa selvagem (EG103) de *Saccharomyces cerevisiae*;
- ❖ Dentre todos os compostos testados, apenas os compostos C3, C5 e C7 foram capazes de resgatar a sobrevivência da mutante *sod1* após exposição ao estresse provocado pelo radical superóxido.
- ❖ Os compostos miméticos a Sod mais promissores, C3, C5 e C7, apresentam um mecanismo de proteção independente do controle da expressão gênica mediada pelo fator de transcrição Yap1;
- ❖ A expressão da proteína Hsp104-GFP foi induzida após o tratamento com os compostos C3, C5 e C7, mostrando que estes compostos podem induzir a resposta celular por ativar Hsf1;
- ❖ Os compostos C3, C5 e C7 foram capazes de ativar as enzimas Sod e catalase de *S. cerevisiae*;
- ❖ Os compostos C3 e C7 foram absorvidos pelas células de *S. cerevisiae*, mostrando um aumento da quantidade de Fe intracelular;
- ❖ Os compostos miméticos, analisados neste trabalho, representam uma plataforma importante no desenvolvimento de novas estratégias capazes de combater os efeitos tóxicos das EROs e de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, D. A. et al. Catalase overexpression reduces lactic acid-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2320–5, abr. 2009.

ALEXEYEV, M. F., LEDOUX, S. P. & WILSON, G. L. Mitochondrial DNA and aging. **Clin Sci (Lond)** v.107, 355-364, 2004

ALMEIDA, V. R.; XAVIER, F. R.; OSÓRIO, R. E. H. M. B.; BESSA, L. M.; SCHILLING, E. L.; COSTA, T. G.; BORTOLOTO, T.; CAVALETT, A.; CASTRO, F. A. V.; VILHENA, F.; ALVES, O. C.; TERENCE, H.; ELEUTHERIO, E. C. A.; PEREIRA, M. D.; HAASE, W.; TOMKOWICZ, Z.; SZPOGANICZ, B.; BORTOLUZI, A. J.; NEVES, A. *In vitro* and *in vivo* activity of a new unsymmetrical dinuclear copper complex containing a derivative ligand of 1,4,7-triazacyclononane: catalytic promiscuity of [Cu₂(L)Cl₃]. **Dalton Transactions**, v. 42, p. 7059 – 7073, 2013.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202 – 2210, 2010.

ANITHA, P.; CHITRAPRIYA, N.; JANG, Y. J.; VISWANATHAMURTHI, P. Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity of new ruthenium(II) complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing 9,10 phenanthrenequinone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 129, p. 17 – 26, 2013.

BAKER, K. *et al.* Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 284, n. 1, p. 215–221, 1998.

BARNHAM, K. J.; BUSH, A. I. Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. **Chemical Society reviews**, v. 43, p. 6727–6749, 2014.

BARONDEAU D. P., KASSMANN C. J., BRUNS C. K., TAINER J. A., GETZOFF E. D.; Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism, **Biochemistry**, v. 43, p. 8038-8047, 2004.

BATINIC-HABERLE, I., SPASOJEVIC, I., HAMBRIGHT, P., BENOVA, L., CRUMBLISS, A.L. & FRIDOVICH, I. **Inorg. Chem.** 38, 4011–4022, 1998

BATINIĆ-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 6, p. 877–918, 2010.

BENJAMIN BÖSL, VALERIE GRIMMINGER, STEFAN WALTER. The molecular chaperone Hsp104—A molecular machine for protein disaggregation. **Journal of Structural Biology**. v.156 p.139–148, 2006.

BRASIL, A. A. *et al.* The involvement of GSH in the activation of human Sod1 linked to FALS in chronologically aged yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 433–440, 2013.

BRUNK, U.T., TERMAN, A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1996–2002, 2002.

BUKHARI, S. B.; MEMON, S.; TAHIR, M. M.; BHANGER, M.I. Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt-quercetin complex. **Journal of Molecular Structure**, v. 892, p. 39 – 46, 2008.

CALABRESE, V. *et al.* Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: Role of vitagenes. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 4-5, p. 757–773, 2007.

CERQUEIRA, F. M. **Consequências da expressão da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1) e sua mutante G93A em neuroblastomas. Implicações para a esclerose lateral amiotrófica.** Universidade de São Paulo, 2007.

CHA, M.-Y.; KIM, D. K.; MOOK-JUNG, I. The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases. **Experimental & molecular medicine**, v. 47, p. e150, jan. 2015.

CLAYTON Q. ALVES e JORGE M. DAVID, *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, No. 10, p. 2202-2210, 2010.

COSTA, V. & MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Mol Aspects Med** v.22, 217-246, 2001

COSTA, V. *et al.* Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. **Microbiology**, v. 143, n. 1 997, p. 1649–1656, 1997.

DASGUPTA, A.; KLEIN, K. Introduction to Free Radicals and the Body's Antioxidant. **Defense Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements**, p. 1 – 18, 2014.

DAUM, G. *et al.* Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. **Biochimie**, v. 89, n. 2, p. 243–248, 2007.

DAY, B. J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 285–296, 2009.

DUFOUR, E.; LARSSON, N. G. Understanding aging: Revealing order out of chaos. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1658, n. 1-2, p. 122–132, 2004.

EL-WAKIEL, N.; EL-KEIY, M.; GABER, M. Synthesis, spectral, antitumor, antioxidant and antimicrobial studies on Cu(II), Ni(II) and Co(II) complexes of 4-[(1H Benzoimidazol-2-ylimino)- methyl]-benzene-1,3-diol, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 147, p. 117 – 123, 2015.

FAULKNER, K. M., LIOCHEV S. I., FRIDOVICH, I. Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 23471- 23476, 1994.

FERNANDES C.; HORN JR., A.; VIEIRA-DA-MOTTA O.; KANASHIRO, M. M.; ROCHA, M. R.; MOREIRA, R. O.; MORCELLI, S. R.; LOPES, B. F.; MATHIAS, L. S.; BORGES, F. V.; BORGES, L. J. H.; FREITAS, W. R.; VISENTIN, L. C.; ALMEIDA, J. C. A.; SCHENK, G. Synthesis, characterization, antibacterial and antitumoral activities of mononuclear zinc complexes containing tridentate amine based ligands with N3 or N2O donor groups. **Inorganica Chimica Acta**, v. 416, p. 35 – 48, 2014.

FERNANDES, C.; HORN JR, A.; LOPES, B. F.; BULL, E. S.; AZEREDO, N. F. B.; KANASHIRO, M. M.; BORGES, F. V.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; PIRES, A. B.; FRANCO, R. W. A; ALMEIDA, J. C. A.; MACIEL, L. L. F.; RESENDE, J. A. L. C.; SCHENK, G. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups *via* interaction with death receptors. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 153, p. 68 – 87, 2015.

FERNANDES, C.; HORN, A.; *et al.* Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 11, p. 1214–1223, 2010.

FLOHÉ, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 93–104, jan. 1984.

GARCÍA-FERNANDÉZ, A. J., BAYOUMI, A. E, PÉREZ-PERTEJO, A., MOTAS, M., REGUERA, R. M., ORDÓÑEZ, C., BALAÑA-FOUCE, R., ORDÓÑEZ, D. Alterations of the glutathione-redox balance induced by metals in CHO-K1 cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 365 - 373, 2002.

GOMES, D. S. *et al.* Apoptosis as a mechanism for removal of mutated cells of *Saccharomyces cerevisiae*: The role of Grx2 under cadmium exposure. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 2, p. 160–166, 2008.

GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M. *et al.* Comparison of protective effects against reactive oxygen species of mononuclear and dinuclear Cu(II) Complexes with N-substituted benzothiazolesulfonamides. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 25, p. 9424–9433, 2005.

GOTTLIEB, M. G. V., CRUZ, I. B. M., SCHWANKE, C. H. A. e BODANESE, L. C. Estresse oxidativo como fator de risco metabólico emergente. **Revista Scientia Medica, Porto Alegre**, v. 20, n. 3, p. 243–249, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HAMBLEY, T. Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities. **Dalton Trans.**, n. 43, p. 4929–4937, 2007a.____. Metal-Based Therapeutics. **Science**, v. 318, p. 12–13, 2007b.

HERDEIRO, R. S. *et al.* Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects**, v. 1760, n. 3, p. 340–346, 2006.

HERRERO, E. *et al.* Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, p. 1217–1235, 2008.

HORN, JR. A., PARRILHA, G., MELO, K. V., FERNANDES, C., HORNER, M., VISENTIN, L., SANTOS, J. A., SANTOS, M. S., ELEUTHERIO, E. C. A. & PEREIRA, M. D. An iron-based cytosolic catalase and superoxide dismutase mimic complex. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1274–1276, 2010.

INES BATINIC-HABERLE, LUDMIL BENOVA, IVAN SPASOJEVIC AND IRWIN FRIDOVICHI. The Ortho Effect Makes Manganese(III) Meso-Tetrakis-(N Methylpyridinium-2-yl)Porphyrin a Powerful and Potentially Useful Superoxide Dismutase Mimic. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 273, No. 38, p. 24521–24528, 1998.

JAESCHKE, H. Antioxidant Defense Mechanisms. **Comprehensive Toxicology**, v. 9, p. 319 – 337, 2010.

JANSSEN, A. M.; BOSMAN, C. B.; SIER, C. F.; GRIFFIOEN, G.; KUBLEN, F. J.; LAMERS, C. B.; VAN-KRIEKEN, J. H.; VAN DE VELDE, C. J., VERSPAGET, H. W. SODs in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 78, p. 1051-1057, 1998.

JOHNSON, F., GIULIVI, C. Superóxide Dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects Medicinal**, v. 26, p. 340-352, 2005.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2-3, p. 65–87, 2011.

KAREN VIEIRA MELO. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de complexos de ferro**. 2012. 140 f. Dissertação apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes, 2012.

KEANEY, M. *et al.* Superoxide dismutase mimetics elevate superoxide dismutase activity in vivo but do not retard aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 2, p. 239–250, 2004.

KEHRER, J. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 14, n. 149(1), p. 43–50, 2000.

KHURANA, V.; LINDQUIST, S. Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 436–449, 2010.

KOPPENOL, W. H. The Haber-Weiss cycle – 70 years later. **Redox Report**, v. 6, n. 4, p. 229–234, 2001.

KUBOTA, S. Dendrimers and their metal complexes having superoxide dismutase activity. **United States Patent**, CODEN: USXXAM US 6410680 B1, 2002.

LABUSCHAGNE, C. F.; BRENKMAN, A. B. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 4, p. 918–930, 2013.

LESSA, J. A., HORN, A. JR., BULL, E. S., ROCHA, M. R. BENASSI, M., CATHARINO, R. R., EBERLIN, M. N., CASELLATO, A., NOBLE, C. J., HANSON, G. R., SCHENK, G., SILVA, G. C., ANTUNES, O. A. C., FERNANDES, C. Catalase vs Peroxidase Activity of a Manganese(II) Compound: Identification of a Mn(III)-(μ-O)₂ Mn(IV) Reaction Intermediate by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. **Inorganic Chemistry**, v. 48, p. 4569-4579, 2009.

LIMOLI, C. L., GIEDZINSKI, E., BAURE, J., DOCTROW, S., ROLA, R. & FIKE, J. Using superoxide dismutase/catalase mimetics To manipulate the redox environment of neural precursor cells. **Radiation Protection Dosimetry**, v.122, No. 1–4, 228–236. 2006
LIU, G. F., FILIPOVIC, M., HEINEMANN, F., & IVANOVIC-BURMAZOVIC, I. Seven-Coordinate Iron and Manganese Complexes with Acyclic and Rigid Pentadentate Chelates and Their Superoxide Dismutase Activity. **Inorg Chem** **46**, 8825-8835, 2007.

LÜ, J.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 840 – 860, 2010.

LUCI MARIA SANT'ANA DUSSE, LAURO MELLO VIEIRA E MARIA DAS GRAÇAS CARVALHO. Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

MACEDO-MÁRQUEZ, A. La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) em las mitocôndrias de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Especializada em Ciencias Químico-Biológicas**, v. 15, p. 97 – 103, 2012.

MACHADO, P. *et al.* Synthesis, characterization and activity of homogeneous and heterogeneous (SiO₂, NaY, MCM-41) iron(III) catalysts on cyclohexane and cyclohexene oxidation. **Applied Catalysis A: General** **507**. p.119–129, 2015.

MAGER, W. H., WINDERICHX, J. Yeast as a model for medical and medicinal research. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, p. 265-273, 2005.

MALFROY-CAMINE, B., DOCTROW, S. R. Synthetic catalytic free radical scavengers useful as antioxidants for prevention and therapy of disease. **United State Patent**, Cont. in-part of U.S. 5,403,834. CODEN: USXXAM US 5827880 A, 1998.

MANISHA N. PATEL. Metalloporphyrins improve the survival of Sod2-deficient neurons. **Blackwell Publishing Ltd**. p. 219–222, 2003.

MANISHA PATEL AND BRIAN J. DAY. Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. **Review**, v.20, 1999.

MAO, P. *et al.* MitoQ, a mitochondria-targeted antioxidant, delays disease progression and alleviates pathogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 12, p. 997–1003, 2013.

MARGIOTTA, N. *et al.* Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of new coordination complexes of platinum and rhenium with a ligand targeting the translocator protein (TSPO). **Dalton Trans.**, v. 43, n. 43, p. 16252–16264, 2014.

MARIANI, D. **Citotoxicidade e função do sistema de defesa antioxidante durante a exposição a ciplastina no modelo *Saccharomyces cerevisiae***. 2008. 146 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GOMEZ, C.; Castro, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603, 1999.

MAURYA, P. K.; NOTO, C.; RIZZO, L. B.; RIOS, A. C.; NUNES, S. O.V.; BARBOSA, D. S.; SETHI, S.; ZENI, M.; MANSUR, R. B.; MAES, M.; BRIETZKE, E. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 65, p. 134 – 144, 2016.

MENEZES, R. A *et al.* Contribution of Yap1 towards *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to arsenic-mediated oxidative stress. **The Biochemical journal**, v. 414, n. 2, p. 301–311, 2008.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: Active sites that save, but a protein that kills. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 2, p. 162–168, 2004.

MIRISOLA, M. G.; BRAUN, R. J.; PETRANOVIC, D. Approaches to study yeast cell aging and death. **FEMS yeast research**, v. 14, p. 109–118, 2013.

MIRIYALA, S. *et al.* Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 794–814, 2012.

MORADAS-FERREIRA, P., COSTA, V., PIPER, P. & MAGER, W. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. **Molecular Microbiology**, v. 19, p. 651-658, 1996.

MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. 4, p. 1157– 1195, 2012.

MOSKOVITZ, J. *et al.* Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 12920–5, 6 nov. 2001.

MUNROE, W., KINGSLEY, C., DURAZO, A., GRALLA, E.B., IMLAY, J.B., SRINIVASAN, C. & VALENTINE, K. Only one of a wide assortment of manganese containing SOD mimicking compounds rescues the slow aerobic growth phenotypes of both *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking superoxide dismutase enzymes. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.101, 1875–1882, 2007

NAVARRO-YEPES, J.; ZAVALA-FLORES, L.; ANANDHAN, A.; WANG, F.; SKOTAK, M.; CHANDRA, N.; LI, M.; PAPPA, A.; MASTINEZ-FONG, D.; RAZO, L. M. D.; QUINTANILLA-VEJA, B.; FRANCO, R. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 142, p. 206 – 230, 2014.

O'BRIEN, E. M. et al. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese- (MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): Evidence that mnsod and cuznsod have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 51817–51827, 2004.

PASCHKE, J., KIRSCH, M., KORTH, H., GROOT, H., SUSTMANN, R., Catalase-Like Activity of a Non-Heme Dibenzo-tetraaza[14]annulene-Fe(III) Complex under Physiological Conditions. **Journal of American Chemical Society**, v. 123, p. 11099–11100, 2001.

PEREIRA, M. D. *et al.* Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1620, n. 1-3, p. 245–251, 2003.

PEREIRA, M. D.; ELEUTHERIO, E. C.; PANEK, A. D. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC microbiology**, v. 1, p. 11, 2001.

PERFEITO, R.; CUNHA-OLIVEIRA, T.; REGO, A. C. Reprint of: Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease - Resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 186–201, 2013.

PIMENTEL, C. et al. Yap1 mediates tolerance to cobalt toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 6, p. 1977–86, jun. 2014.

RAHA, S., ROBINSON, B. H., Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, Issue 10, p. 502-508, 2000.

RAHAT, O.; MAOZ, N.; COHEN, H. Y. Multiple pathways regulating the calorie restriction response in yeast. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 66 A, n. 2, p. 163–169, 2011.

RAUEN, U. *et al.* Protection against iron- and hydrogen peroxide-dependent cell injuries by a novel synthetic iron catalase mimic and its precursor, the iron-free ligand. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1369–1383, 2004.

RAVICHANDRAM, R.; GURUMOORTHY, P.; MUSTHAFA, M. A. I.; RAHIMAN, A. K. Antioxidant, DNA binding and nuclease activities of heteroleptic copper(II) complexes derived from 2-((2-(piperazin-1-yl)ethylimino)methyl)-4-substituted phenols and diimines. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 785 – 793, 2014a.

RAVICHANDRAM, R.; RAJENDRAN, M.; DEVAPIRIAM, D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. **Food Chemistry**, v. 146, p. 472 – 478, 2014b.

RIBEIRO, T. DE P. **Redução das lesões oxidativas geradas pelo envelhecimento cronológico em células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a tratamentos com novos complexos metálicos.** 2011. 95 f. Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2011.

RIBEIRO, T. P. *et al.* Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 67–76, 2015.

RIBEIRO, T.P.; FONSECA, F.L.; CARVALHO M.D.C.; GODINHO, R.M. DA C.; ALMEIDA F.P.; SAINT'PIERRE, T.D., REY, N.A.; FERNANDES, C.7; HORN, JR. A.; PEREIRA, M.D. Metal-based superoxide dismutase and catalase mimics reduce oxidative stress biomarkers and extend life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, p. 301-315, 2017.

RISTOW, M.; SCHMEISSER, S. Extending life span by increasing oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 327–336, 2011.

RUCKENSTUHL, C.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; MADEO, F. The sweet taste of death: Glucose triggers apoptosis during yeast chronological aging. **Aging**, v. 2, n. 10, p. 643–649, 2010.

SÁ, R. A *et al.* Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. **Brazilian journal of microbiology**, v. 44, p. 993–1000, 2013.

SAFAVI, M. *et al.* Complexes of 2-hydroxyacetophenone semicarbazones: A novel series of superoxide dismutase mimetics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 3070–3073, 2010.

SAMILA RIBEIRO MORCELLI. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antioxidante e antitumoral de compostos de coordenação de cobalto e ferro**. 2016. 142 f. Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, 2016.
SANJAY, M. K. *et al.* Copper, Zinc-Superoxide Dismutase from Clinically Isolated *Escherichia coli*: Cloning, Analysis of *sodC* and Its Possible Role in Pathogenicity. **Indian journal of microbiology**, v. 51, n. 3, p. 326–31, jul. 2011.

SCOTT, M. D.; MESHNICK, S. R.; EATON, J. W. Superoxide dismutase-rich bacteria. Paradoxical increase in oxidant toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 8, p. 3640–3645, 1987.

SEMCHYSHYN, H. M. *et al.* Fructose and glucose differentially affect aging and carbonyl/oxidative stress parameters in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 7, p. 933–938, 2011.

SHENG, Y. *et al.* A Comparison of Two Yeast MnSODs: Mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* versus Cytosolic *Candida albicans*. **J Am Chem Soc**, v. 28, n. 51, p. 20878–20889, 2011.

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. **Annual review of nutrition**, v. 25, p. 151–174, 2005.

ŠTARHA, P.; TRÁVNÍČEK, Z.; HERCHEL, R.; POPA, I.; SUCHÝ, P.; VANČO, J. Dinuclear copper(II) complexes containing 6-(benzylamino)purines as bridging ligands: Synthesis, characterization, and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 432 – 440, 2009.

STRYER, L. **Bioquímica**, 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010.

SUSTMANN, R. *et al.* Catalase Mimics. **Inorg. Chem.**, v. 46, n. 26, p. 270–281, 2007.
TELPOUKHOVSKAIA, M. A.; ORVIG, C. Werner coordination chemistry and neurodegeneration. **Chemical Society Reviews**, 2013.

TAN, C.; LU, Y.; JI, L.; MAO, Z. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds, **Metallomics**, v. 6, p. 953 – 1098, 2014.

TENREIRO, S.; OUTEIRO, T. F. Simple is good: Yeast models of neurodegeneration. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 8, p. 970–979, 2010.

THALES DE PAULA RIBEIRO. **Estudo da ação antioxidante de 4 compostos miméticos e suas aplicações contra a agregação citotóxica da alfa-sinucleína**. 2016. 220 f. Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2016.

THANAN, R. *et al.* Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 193 217, jan. 2014.

TOLEDANO, M. B. **Yeast Stress Responses**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2003.

VALENTINE, J. S.; DOUCETTE, P. A; ZITTIN POTTER, S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. **Annual review of biochemistry**, v. 74, p. 563–593, 2005.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M. & TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Journal Biochem Cell Biol** v.39, 44-84, 2007.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161–1208, 2005.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOLA, J.; IZAKOVIC, A.; MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1–40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M. M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de nano oxidativo em sangue humano: principais métodos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323 – 1338, 2007.

VIGNESWARA, V. *et al.* Molecular Ageing of Alpha- and Beta-Synucleins: Protein Damage and Repair Mechanisms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–12, 2013.

WANG, F.; YIN, H.; CUI, J.; ZHANG, Y.; GENG, H.; HONG, M. Synthesis, structural characterization, in vitro cytotoxicities, DNA-binding and BSA interaction of diorganotin (IV) complexes derived from hydrazone Schiff base. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 759, p.83 – 91, 2014.

WEITNER, T.; KOS, I.; SHENG, H.; TOVMASYAN, A.; REBOUCAS, J. S.; FAN, P.; WARNER, D. S.; VUJASKOVIC, Z.; BATINIC-HARBELE, I.; SPASOJEVIC, I. Comprehensive pharmacokinetic studies and oral bioavailability of two Mn porphyrin-based SOD mimics, MnTE-2-PyP5+ and MnTnHex-2-PyP5+. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 58, p. 73 – 80, 2013.

WILLCOX, J.K., ASH, S.L. & CATIGNANI, G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease, **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v.4, 275–295, 2004.

XIANG, L. *et al.* Anti-aging effects of phloridzin, an apple polyphenol, on yeast via the SOD and Sir2 genes. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 854–858, 2011.

YE, Y. *et al.* Gaining insight into the response logic of *Saccharomyces cerevisiae* to heat shock by combining expression profiles with metabolic pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 385, n. 3, p. 357–362, 2009.

YU, S. *et al.* Compromised cellular responses to DNA damage accelerate chronological aging by incurring cell wall fragility in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 3573–3583, 2012.

ZAMOCKY M, FURTMÜLLER PG, OBINGER C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.10, p.1527–1547, 2008.