

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**REGULAÇÃO GÊNICA DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES *IN VITRO*, MEDIADAS PELO
EXTRATO DAS CASCAS DO CAULE DE *Bertholletia excelsa*, EM MACRÓFAGOS SOB
ESTRESSE OXIDATIVO**

Bolsista: Érico Jorge Silva Freitas, CNPq

MANAUS

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0118/2014

**REGULAÇÃO GÊNICA DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES *IN VITRO*, MEDIADAS PELO
EXTRATO DAS CASCAS DO CAULE DE *Bertholletia excelsa*, EM MACRÓFAGOS SOB
ESTRESSE OXIDATIVO**

**Bolsista: Érico Jorge Silva Freitas, CNPq
Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima**

MANAUS

2015

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Resumo

O estresse oxidativo é causado pelo excesso de radicais livres, oriundos do metabolismo celular ou por meio de estímulos exógenos (radiação, toxinas, drogas, produtos químicos). A ativação de diversas enzimas na resposta imunológica intensificam a expressão de proteínas de defesa. A fim de induzir uma resposta imunológica não enzimática, utilizam-se substâncias antioxidantes, como compostos fenólicos, para evitar a formação de radicais livres. Este trabalho tem objetivo de avaliar a regulação gênica das defesas antioxidantes *in vitro*, mediadas pelo extrato das cascas do caule de *Bertholletia excelsa*, em macrófagos murinos J774 sob estresse oxidativo. As culturas de célula foram expostas a um agente oxidante, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), para simular o estresse oxidativo, promovendo maior expressão de proteínas de defesa. As células foram tratadas com extrato da casca do caule de *B. excelsa* e com o padrão quercetina. Posteriormente as amostras foram conduzidas à extração do RNA, seguindo para técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real e quantificação da expressão proteica. Ensaio feitos com DPPH e de ABTS^{•+} comprovaram a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *B. excelsa*. Foi observado que o tratamento com o extrato de *B. excelsa* protegeu efetivamente as células expostas ao peróxido de hidrogênio pelo teste de viabilidade celular. A modulação da expressão gênica nas células tratadas com o extrato mostrou-se positiva, visto que houve uma queda significativa da expressão dos genes Gpx, Nfr2, NOS2, PRDX2 mediante a presença do tratamento com o extrato de *B. excelsa*. As maiores concentrações do extrato conseguiram se mostrar extremamente eficientes na redução da expressão, inclusive superiores ao padrão quercetina, o que demonstra uma potente atividade antioxidante. Os estudos sobre regulação da expressão genica revelaram que os antioxidantes, como compostos fenólicos, possuem participação direta na prevenção do dano celular e tecidual mediante captura de radicais livres e diminuição da expressão de proteínas de defesa. Estes achados comprovam o efeito antioxidante do extrato de *B. excelsa* e sua capacidade de alterar a regulação gênica.

Palavras-Chave: estresse oxidativo, fenólicos, PCR, *Bertholletia excelsa*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Matéria prima.....	10
3.2 Preparação do extrato seco	10
3.3 Atividade antioxidante celular	10
3.4 Indução do estresse oxidativo celular.....	10
3.5 Extração do RNA.....	11
3.6 Síntese de cDNA	11
3.7 Avaliação da expressão gênica.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
Atividade antioxidante	Erro! Indicador não definido.
Oxido nítrico sintase 2.....	Erro! Indicador não definido.
Fator NFR2.....	14
GPx1	15
PRDX2	16
5. CONCLUSÃO	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

1. INTRODUÇÃO

O mecanismo de formação e regulação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) é de suma importância para a compreensão de eventos celulares relacionados à sobrevivência, morte e proliferação celular (RIBEIRO, S.M.R *et al.* 2005). A formação desses agentes se dá por meio de processos fisiológicos, patológicos e/ou por exposição a agentes tóxicos (drogas, xenobióticos, radiação). As ERO são metabólitos reativos formados a partir da redução parcial do oxigênio, podendo causar danos a componentes celulares, tais como DNA, lipídios e proteínas. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As ERO exercem papéis fisiológicos, como na reação contra patógenos, na sinalização celular, modulação da expressão enzimática, dentre outras funções, porém, quando em excesso, temos como resultado o estresse oxidativo, que é responsável pela perturbação de mecanismos homeostáticos celulares através da alteração de macromoléculas. Alguns dos principais compostos responsáveis por mediar dano oxidativo são: Radical Superóxido (O_2^-), Radical Hidroxila (HO^-), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), dentre outros.

O radical superóxido (O_2^-) origina-se da adição de um elétron ao oxigênio molecular. Por ser uma molécula carregada negativamente, ela não consegue transpor a membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Acredita-se que 1-2% do oxigênio reduzido pela mitocôndria é convertido em ânion superóxido durante a respiração celular (DRÖSE; BRANDT, 2012;).

O H_2O_2 é permeável às membranas celulares, podendo exercer seus efeitos longe do local de produção (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Entretanto, radical hidroxila (OH^-) é mais reativo, podendo oxidar quaisquer moléculas biológicas. Devido a sua alta reatividade o OH^- não consegue difundir para outros locais, agindo diretamente nos locais aonde foi produzido (IMLAY, 2003).

Além das ERO, há espécies reativas de nitrogênio (ERN). O óxido nítrico (NO) é envolvido em diversos processos fisiológicos como regulação da pressão arterial, regulação do sistema imune e neurotransmissão (BERGENDI *et al.*, 1999). Porém o seu excesso pode ocasionar o 'estresse nitrosativo', podendo alterar macromoléculas (MANCARDI *et al.*, 2004).

Em condições normais os peroxissomos possuem uma grande quantidade da enzima catalase, que degrada H_2O_2 presente em altas concentrações em seu interior. Em situações patológicas, danos aos peroxissomos podem liberar H_2O_2 para fora dessas organelas, contribuindo para o estresse oxidativo.

A membrana celular é uma das estruturas mais afetadas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta em alterações estrutural e de permeabilidade,

consequentemente acarretando na perda de seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, formação de produtos citotóxicos (como malonaldeído), culminando na morte celular (FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. 1997).

Para evitar os danos oxidativos, as células possuem mecanismos de defesas antioxidantes. Antioxidante é qualquer molécula que, em baixa concentração, quando comparado a um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os antioxidantes podem ser divididos em: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Dos não enzimáticos podemos destacar o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), beta caroteno, glutathione (GSH), polifenóis, entre outros. A célula ainda conta com uma grande variedade de enzimas capazes de neutralizar ERO e ERN, como a glutathioneperoxidase (GPx), peroxirredoxinas (Prdx), catalase(CAT), superóxido dismutase (SOD).

A SOD é um dos mais eficientes antioxidantes celulares endógenos por catalisar o $^1\text{O}_2^-$ em O_2 e em H_2O_2 . Na célula podem ser encontradas duas variações de SOD. Na mitocôndria a SOD se encontra ligada ao magnésio (MnSOD), e no citosol possui cobre e zinco no seu sítio ativo (CuZnSOD) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O NO^* , produzido pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS), tem sua expressão aumentada sob condições fisiológicas e patológicas (BAYIR et al., 2007). O NO^* também pode interagir com o $^1\text{O}_2^-$ para formar o peroxinitrito (ONOO^-). O ONOO^- é uma molécula altamente reativa, mediadora de danos oxidativos em várias patologias, dentre elas a Diabetes (SILVA, N. R.; COSTA, C. E. M. 2008).

A GPx é uma enzima dependente de selênio, encontrada no citosol e na matriz mitocondrial (SILVA; NAVES, 2001). A GPx catalisa a redução do H_2O_2 pela peroxidação da glutathione (GSH), tendo como produto a glutathione na forma dissulfeto oxidada (GSSH) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A proteína Nrf2 é uma das proteínas ativadas na presença de ERO, responsável por coordenar a expressão de diversas proteínas, juntamente com a Keap-1, seu inibidor, compõe o sistema Nrf2/Keap-1. (COVAS, 2011). A ativação desse sistema pode ser induzida na presença de ERO. Em condições basais essa proteína se encontra ligada a duas moléculas de Keap-1, inativa, apresentando níveis basais baixos. Quando em estresse oxidativo, esses compostos oxidam resíduos de cisteína da Keap-1 de forma que há a liberação de Nrf2. (FOURQUET et al. 2010).

A identificação de genes responsáveis por regular o mecanismo de defesa celular contra o estresse oxidativo são de extrema importância para compreendermos seu papel na proteção tecidual e celular contra elementos químicos tóxicos. Descobertas recentes apoiam que os elementos de resposta antioxidante são capazes de regular a expressão de enzimas antioxidantes, podendo ocorrer naturalmente devido a presença de agentes Fenólicos.

Os compostos fenólicos são compostos mais abundantes na dieta, de maior concentração em frutas, hortaliças e derivados, sendo encontrado em diversos alimentos, como chá verde, cacau, açaí (CERQUEIRA et al., 2007). Entre as classes mais estudadas estão os flavonóis, catequinas, antocianidinas e isoflavonas. Vários estudos relacionados ao estresse oxidativo comprovam que esses compostos possuem potencial antioxidante (NEVES, L. C. ALENCAR, S. M. CARPES, 2009).

Estudos realizados *in vitro*, demonstraram que os compostos polifenólicos encontrados nas plantas, podem participar de processos anticarcinogênicos pelo seu alto potencial antioxidante capaz de captar radicais livres como o O_2^- , HO^- , NO^- e $ONOO^-$. Os compostos fenólicos possuem várias vias de ação antioxidante, entre elas a doação de elétrons para os radicais livres, a quelatação de metais de transição, como Fe^+ , e o Cu^+ , à reparação da lesão das moléculas atacadas por ERO. (MANACH et al., 2004).

É comprovado que substâncias com núcleos fenólicos, como tocoferol e flavonoides, atuam como captadores de espécies reativas de oxigênio, portanto, atuam prevenindo a oxidação tanto de lipídeos como outras moléculas, retardando o envelhecimento e prevenindo diversas doenças (NEVES, L. C. ALENCAR, S. M. CARPES, 2009). Ao contrário da Vitamina C e E os compostos fenólicos tem a propriedade de atuar em meios aquosos e lipídicos, o que os tornam compostos de ação mais rápida que as vitaminas (ABROS et al, 2010).

Estudos apontaram a presença de grande quantidade de compostos fenólicos na casca do caule de *B. excelsa*, popularmente conhecida como Castanha-do-Brasil, uma amêndoa nativa da região Amazônica, da família Lecythidaceae, uma das maiores riquezas da região (SANTOS, 2007). Sua produção concentra-se nos estados do Amazonas, Pará e Acre, responsáveis por 80% (SILVA, 2010). Utilizando extrato da casca de *B. excelsa*, para promover a regulação de enzimas antioxidantes a células expostas ao estresse oxidativo, a avaliação da expressão gênica poderá esclarecer vários aspectos desse fenômeno, podendo contribuir para o diagnóstico, mecanismo de ação e monitoramento dos resultados de procedimentos terapêuticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a regulação gênica das defesas antioxidantes *in vitro*, mediadas pelo extrato das cascas do caule de *B. excelsa*, em macrófagos murinos J774 sob estresse oxidativo.

2.2 Objetivos Específicos

Induzir resposta oxidativa em Macrófagos murinos J774.

Conhecer o efeito antioxidante do extrato de *B. excelsa* em macrófagos murinos J774 submetidos a condições de estresse oxidativo

Avaliar a regulação dos genes NOS2, PRDX2, Nrf2, GPx1 em macrófagos submetidos ao estresse oxidativo e tratados com o extrato de *B. excelsa*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria prima

As Cascas de *Bertholletia excelsa* foram coletadas na *Reserva ducke* e fornecidas pelo grupo do Prof.Dr. Anderson Guimaraes da UFAM-ITACOATICARA.

3.2 Preparação do extrato seco

A amostra, seca e triturada, foi utilizada para a preparação do extrato hidroalcolico, deixada sob maceração a frio durante 72h, com a proporção de (1:1) com relação de droga solvente de 5%. A extração com etanol apresenta melhor qualidade, estabilidade e composição de compostos bioativos (REZENDE, 2013). Após o período de tempo, o líquido foi filtrado e seco por nebulização (spray drier) sem adição de adjuvantes.

3.3 Atividade antioxidante celular

As células utilizadas para avaliação da atividade antioxidante foram as da linhagem de macrófagos murinos J774, segundo o método descrito por WOLFE e LIU (2007). Cultivados 1×10^6 células por poço em placa de 96 poços. As células passaram por um período de incubação de 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Feita a remoção do meio, os poços foram lavados com PBS e as células tratadas em triplicata com 100 µL de tampão de Hanks contendo 10 µmol de diclorofluoresceína, seguida de incubação por 30 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Terminado período de incubação, foi feito o descarte da solução e as células novamente foram lavadas com PBS. Em sequencia, foram adicionados 50 µL de solução contendo diferentes concentrações dos compostos (10, 50 e 100 µg/mL) juntamente com 50 µL de tampão de Hanks para que seja feita a leitura da placa no leitor (DTX 800, Beckman) com excitação 485 nm e emissão 535 nm a cada 10 minutos até 60 minutos. Utilizou-se como padrão para o teste a quercetina na concentração de 10 µg/mL. A amostra teve subtraído o valor de fluorescência do branco no respectivo tempo. O potencial antioxidante foi expresso em unidades de fluorescência. A concentração inibitória mediana (CI₅₀) foi calculada para o tempo de 60 minutos conforme a formula abaixo:

$$\Delta F = (\text{fluorescência aos 60 minutos} - \Delta \text{fluorescência aos 0 minutos})$$

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\Delta F \text{ amostra} / \Delta F \text{ controle}) \times 100$$

3.4 Indução do estresse oxidativo celular

Promoveu-se a indução do estresse oxidativo, utilizando a mesma linhagem de células, macrófagos murinos J774, seguindo o método adaptado a partir do trabalho de Bak e colaboradores (2012). Cultivados 1×10^6 células por poço em placa de 96

poços. Após um período de incubação de 24 horas em estufa e CO₂ a 37 °C, o meio foi removido e os poços lavados com PBS, as células tratadas em triplicata com 100 µL de tampão de Hanks contendo 250µmol de H₂O₂ juntamente com diferentes concentrações do extrato de *B. excelsa* (10, 50 e 100 µg/mL). Após diferentes tempos de incubação com os extratos em que há ou não presença do H₂O₂, as amostras das células foram retiradas para extração do RNA e estudo da expressão gênica relacionada à resposta antioxidante.

3.5 Extração do RNA

O RNA das amostras, extraído pelo método de Trizol (*Invitrogen*) segundo protocolos do fabricante. Utilizando 200 µL da amostra, foi feita a homogeneização com 500 µL de Trizol e a incubação no gelo por 15 minutos, o que proporcionou a lise dos componentes celulares. As proteínas foram removidas pela adição de 400 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, seguida por centrifugação a 12000 RPM a 8°C por 30 minutos. Transferiu-se a fase aquosa formada para um novo tubo estéril, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol, seguido de incubação de 15 minutos em gelo. Após este tempo, foi feita centrifugação a 12000 RPM por 10 minutos a 4°C, o RNA se encontrou sedimentado e lavado com 500 µL de etanol a 75%, centrifugado a 8000 RMP por 10 minutos a 4°C, e ressuspenso em 100 µL de H₂O DEPC (dietilpirocarbonato) livre de RNase, com utilização de 1,0 µL (40 unidades) de *RNaseOUT Recombinant Ribonuclease inhibitor* (*Invitrogen*). Após esta etapa o RNA ressuspenso foi mantido em freezer a -80°C .

3.6 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita utilizando 1 µg do RNA extraído para submeter a transcrição reversa utilizando kit '*High Capacity cDNA Reverse Transcription*' (*Applied Biosystems*) seguindo o protocolo do fabricante.

Adiciona-se 2,0 µL de tampão 10X, 1,0 µL de desoxiribonucleotídeos (dNTPs) na concentração de 100 mM, 0,5 µL da enzima *Reverse Transcriptase*, 1,0 µL de 10X RT Random *primer* e 5,3 µL de água livre de RNase e DNase. Ao final, incubados no termociclador por 10 minutos a 25°C, por 120 minutos a 37°C e 5 segundos a 85°C.

3.7 Avaliação da expressão gênica

A expressão gênica dos genes de interesse foi realizada por PCR em tempo real na plataforma StepOnePlus™ v. 2.0 (*Applied Biosystems*) utilizando-se placas ópticas de 96 poços e sistema TaqMan®, utilizando o KIT *RT² PreAMP cDNA Synthesis Primer Mix*, seguindo procedimento analítico recomendados pelo fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para efetuar a análise da expressão genica foi realizada a quantificação da expressão genica de todos os genes estudados, verificando a intensidade de sua expressão mediante diferentes concentrações de H₂O₂, padrão Quercetina (Qt), e diferentes concentrações de extrato de *B. excelsa* (BEC).

Primeiramente foi analisada viabilidade celular (Figura 1) no qual se verificou que a concentração de 250µM de H₂O₂ apresentou índice de mortalidade de aproximadamente 40%, alto o bastante para haver comparações entre os agentes antioxidantes. Foram escolhidas as concentrações de 10µg de Qt, por esta apresentar melhor resultado de proteção celular, quanto a BEC, optou-se por utilizar variações de 10µg, 50µg e 100µg por essa faixa ter apresentado uma maior proteção celular.

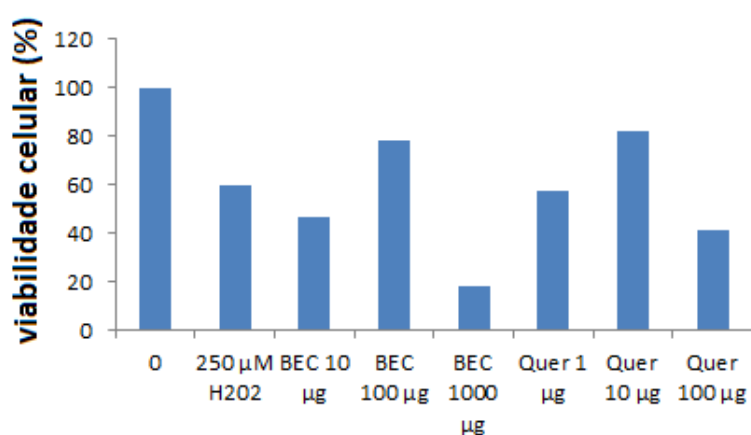


Figura 1: A porcentagem de células vivas mediante a análise de toxicidade das diferentes concentrações de Peróxido de Hidrogênio (250µM), *B. excelsa* e Quercetina.

Os genes estudados foram NOS2, GPx, PRDX2 e NFR2 apresentaram os seguintes valores com relação a expressão gênica. Como resposta fisiológica a situação de estresse oxidativo, o organismo aumenta o nível dos antioxidantes endógenos, glutathiona e as enzimas antioxidantes (BENZIE et al., 2003).

Comprovando atividade antioxidante do extrato de *B. excelsa*, utilizou-se o ensaio de DPPH em várias diluições (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) e o ensaio da captura do radical ABTS^{*+}, incluindo a sua comparação com a curva padrão de Quercetina, demonstrando o potencial de redução do extrato expresso em porcentagem de inibição.

O extrato da casca do caule de *B. excelsa* (A) revelou-se um bom antioxidante, obtendo valor de concentração inibitória (CI50) aproximado a Quercetina (B) observado no teste de DPPH (Figura 2).

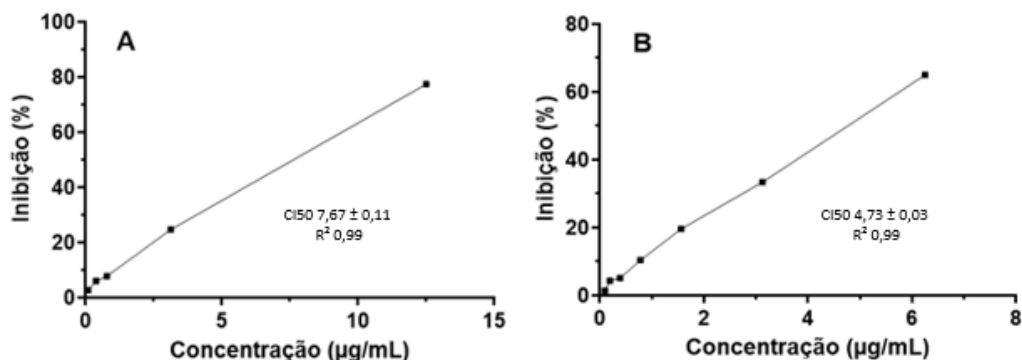


Figura 2: O gráfico A apresenta a curva com as diluições do extrato de *Bertholletia excelsa*, enquanto o gráfico B representa a curva do padrão Quercetina no método de DPPH.

Ensaio realizado com metodologia semelhante, utilizando como padrão vitamina C (176,1 g/mol), obteve valor para CI50 de 4,9 mg/mL. Comparando os resultados, percebeu-se que o extrato hidroetanólico de *B. excelsa*, com valor de CI50 7,67 mg/mL, aproximou-se a atividade antioxidante da vitamina C.

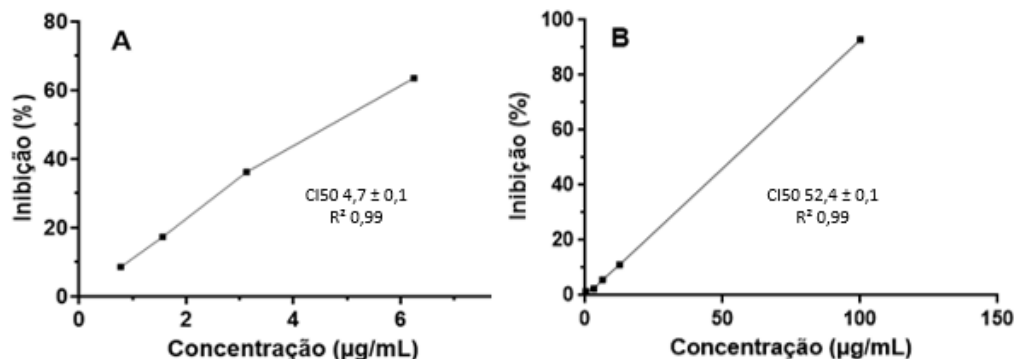


Figura 3: O gráfico A apresenta a curva com as diluições do extrato de *Bertholletia excelsa*, enquanto o gráfico B representa a curva do padrão Quercetina no método de ABTS*+.

O potencial antioxidante da *B. excelsa* (A) pelo método de captura do radical ABTS*+ (Figura 3) confirmou potente atividade antioxidante demonstrando superioridade a Quercetina (B) por ter apresentado CI50 mais baixo em comparação ao padrão.

Influencia na expressão gênica

A Oxido nítrico sintase é responsável pela síntese de oxido nítrico (NO) que exerce funções fisiológicas importantes como potente vasodilatador, entretanto a sua expressão pode ser aumentada sob condições patológicas (BAYIR et al., 2007). O NO também age interagindo com radicais livres originando peroxinitrito (ONOO⁻) que é

uma molécula altamente reativa, mediadora de danos oxidativos (SILVA, N. R.; COSTA, C. E. M. 2008).

A análise da expressão gênica (Figura 4) demonstrou que na presença do H₂O₂, houve um aumento significativo dessa proteína. Entretanto, perante presença de agentes antioxidante, verificou-se redução significativa dessa expressão. O que já era esperado devido a capacidade antioxidante das amostras que interagem com os ERO impedindo no caso a formação de outras espécies reativas e minimizando danos celulares causado pela formação de peroxinitrito (ONOO⁻). A BEC demonstrou superior eficiência em relação a quercetina quando nas concentrações de 100uM.

Estudos similares apresentaram a prevenção de danos ao DNA, a peroxidação lipídica e o aumento da expressão proteica e genicas de isoformas da NOS (NOS1,2,3) mediante suplementação de extratos contendo grande quantidade de compostos antioxidantes (COLOMBO, N.B.R., 2013).

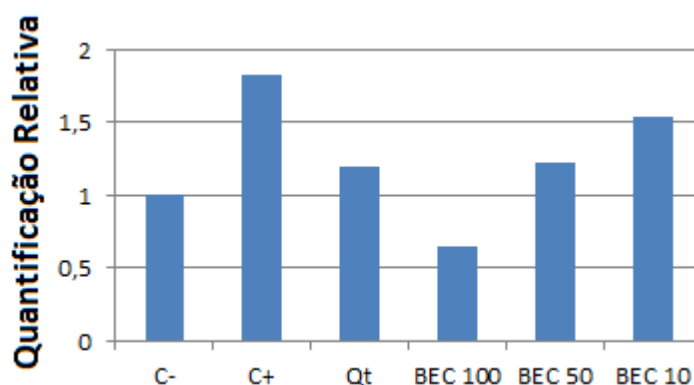


Figura 4: Quantificação relativa do gene *Oxido nítrico sintase 2* em macrofagos murinos (J774) expostos (C+) ou não (C-) a tratamento com H₂O₂ (250 uM), Quercetina 10 ug/mL (Qt) ou diferentes concentrações de extrato de *B. excelsa*.

Fator NRF2

O fator de transcrição NRF2 atua ativando genes citoprotetores, que favorece a sobrevivência das células mediante ao estresse oxidativo. Em condições normais é encontrado em baixas concentrações, por estar em sua forma inibitória, na qual está acoplado a duas moléculas de proteína Keap-1. A proteína Keap-1 contém resíduos de cisteína os quais podem ser oxidados em decorrência de um aumento dos níveis de ERO, promovendo mudanças conformacionais que libertam a proteína NRF2, ficando esta biologicamente ativa (COVAS, G.N.V.G. 2011).

Como evidenciado na figura 5, houve um aumento significativo na expressão de Nfr2 quando na presença de peróxido de hidrogênio. Houve ainda uma redução da expressão gênica quando na presença do padrão quercetina (Qt) e da BEC estudada. Porém, os níveis de Nfr2 continuaram ligeiramente acima do nível padrão do controle (C-). Estudos anteriores demonstraram que diversos flavonoides também são capazes de mediar a translocação do fator de transcrição Nrf2 para o núcleo, aumentando,

assim, a síntese de PRDX, GPx, heme oxigenase, entre outras enzimas protetoras, por meio de ativação do elemento de resposta antioxidante (ARE) (COVAS, G.N.V.G. 2011).

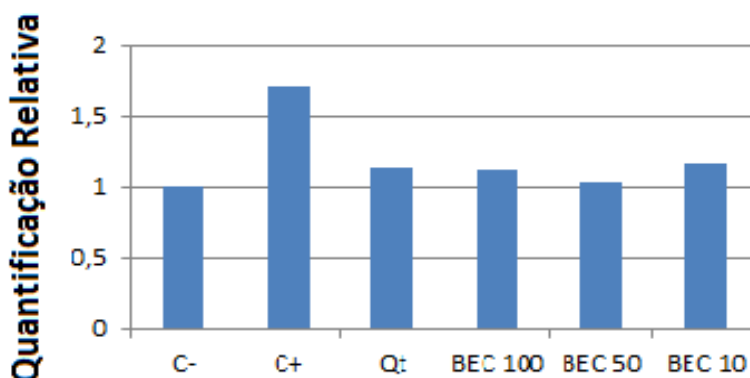


Figura 5: Quantificação relativa do gene do Fator de Transcrição NFR2 em macrófagos murinos (J774) expostos (C+) ou não (C-) a tratamento com H₂O₂ (250 µM), com Quercetina 10 µg/mL (Qt) ou diferentes concentrações de extrato de *B. excelsa*.

GPx1

A Glutathione (GSH) é um tiol não proteico, abundante em células de mamíferos e possui grande capacidade redutora. A concentração de GSH varia de acordo com o tipo de célula, mas é encontrada em todos os compartimentos celulares. A GSH pode tanto neutralizar diretamente o radical hidroxila como pode ser utilizado pela GPx na degradação do H₂O₂ formando a Glutathione Oxidada (GSSG). A GPx1 é citosólica, de suma importância para manter os níveis de peróxidos intracelulares em concentrações não tóxicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os níveis de expressão de GPx1 (Figura 6) se mostraram elevados em todas as amostras estudadas. Isso comprova a sua função específica para degradação do H₂O₂. Os níveis de expressão de GPx na amostra contendo Qt se mostraram-se significativamente elevados quando comparados as amostras, isso pode ser atribuído a uma menor eficiência da Qt quando comparada a BEC, mesmo diante de um aumento natural da expressão genética ocasionado pelos compostos fenólicos deslocando o fator Nrf2 a intensificar a produção dessas enzimas. Podemos verificar a maior redução da expressão na amostra BEC100, demonstra efetividade na captura de radicais livres.

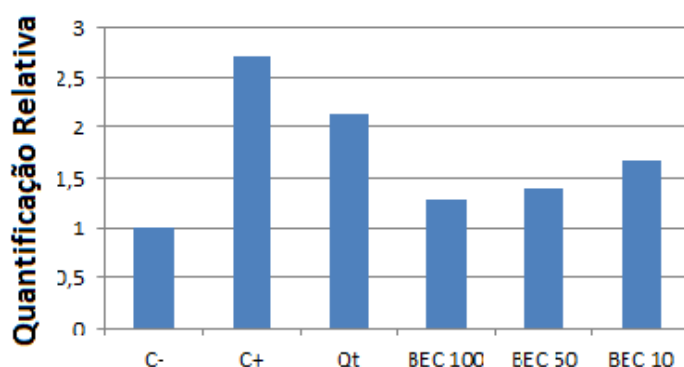


Figura 6: Quantificação relativa do gene Glutathione peroxidase (GPx) em macrófagos murinos (J774) expostos (C+) ou não (C-) a tratamento com H₂O₂ (250 µM), com Quercetina 10 µg/mL (Qt) ou diferentes concentrações de extrato de *B. excelsa*.

PRDX2

Estudos apresentam a eficiência do sistema antioxidante celular e demonstram que as peroxirredoxinas destacam-se pela abundância e reatividade. Seus níveis de atividade estão relacionados a concentração de ERO (KANG et al, 2005).

Estudos demonstram que a PRDX1 possui funções de regulação celular mediante ação de H_2O_2 , para proteger a célula da morte celular causado pelo estresse oxidativo (ROMANELLO, K.S. 2013). Entretanto, “a PRDX1 apresenta 91% de homologias com a PRDX2, ambas possuem o mesmo mecanismo catalítico e semelhança cinética” (ROMANELLO, K.S. apud CHAE et al.,1999).

A expressão de PRDX2 (Figura 7) é positivamente regulada pelos níveis de estresse oxidativo via de fator de transcrição Nfr2 (LOPES, 2014). Esses dados corroboram análise gráfica, os níveis em que na presença de compostos fenólicos como a Qt e a BEC tenderam a se manter próximo do padrão C-. Estudos apontam que a PRDX1 pode ser secretada após a estimulação de algumas citosinas, dentre elas a Interleucina-1 (CHANG et al., 2006) o que justifica a sua ligeira superioridade em relação ao controle C-.

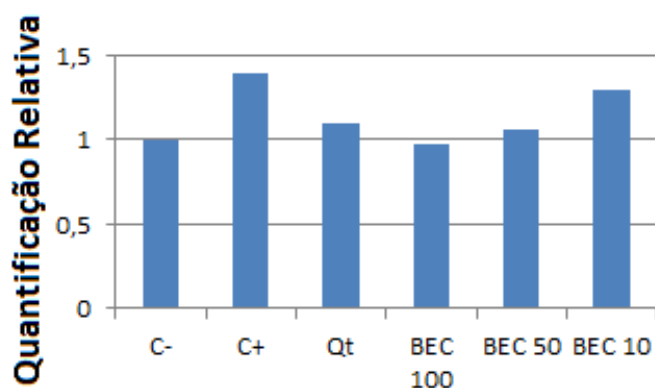


Figura 7: Quantificação relativa do gene Peroxirredoxidase 2 (PRDX2) em macrofagos murinos (J774) expostos (C+) ou não (C-) a tratamento com peróxido de hidrogênio (250 μ M) e tratadas com Quercetina 10 μ g/mL (Qt10) ou diferentes concentrações de extrato de *Berthotelia Excelsa*.

Tabela: Níveis de expressão de proteínas mediante exposição a H_2O_2 , *B. excelsa* e quercetina

Como visto na tabela 2, houve aumento da expressão gênica em todas as amostras expostas ao H₂O₂ bem como a redução da expressão observada nos extratos de BEC e padrão Quercetina.

	H ₂ O ₂	BEC	Qt
NOS2	↑	↓	↓
NFR2	↑	↓	↓
GPx	↑	↓	↓
PRDx2	↑	↓	↓

Tabela 2: Análise comparativa do efeito do extrato de *B. excelsa* em macrófagos tratados com peróxido e hidrogênio em “genes antioxidantes”.

5. CONCLUSÃO

Foi constatado que a adição de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) no meio celular estimulou positivamente a expressão gênica mediante regulação do mecanismo de defesa às ERO e ERN formadas pelo estresse oxidativo.

Em contrapartida, os efeitos do extrato da casca do caule de *B. excelsa* na regulação de expressão proteica mostrou-se extremamente efetivo ao qual houve redução de expressão dos genes ativados na defesa celular ao estresse oxidante, demonstrando sua efetividade na captura de radicais livres e proteção celular.

Observou-se que nos genes estudados, quando na presença do extrato do caule de *B. excelsa*, houve redução significativa de sua expressão quando comparado ao controle positivo (H₂O₂) e ao padrão quercetina (Qt). O que demonstra sua capacidade antioxidante e participação direta de antioxidantes e compostos fenólicos no mecanismo de regulação da expressão gênica.

Este trabalho abre margem para futuros estudos com compostos antioxidantes, sobretudo compostos fenólicos, sua participação na expressão gênica de diversas outras proteínas responsáveis pelo mecanismo de defesa celular às espécies reativas de oxigênio a fim de elucidar cada vez mais suas vias de regulação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.L.A. Ferreira, L.S. Matsubara. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo** Rev. Assoc. Med. Bras. vol.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997.

ABROS, K.A; FREITAS, R.J.S. de; STERTZ, S.C; DORNAS, M.F; **Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas convencionais**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 30(2): 501-506, abr.-jun. 2010.

BAK, M.; OK, S.; JUN M.; JEON, W.; **6-SHOGAOL-RICH EXTRACT FROM GINGER UP-REGULATES THE ANTIOXDANT DEFENSE SYSTEMS IN CELLS AND MICE**. *Molecules* **2012**, 17, 8037-8055; doi:10.3390/molecules17078037.

BAK, M.J.; Jun, M.; Jeong, W.S. **Antioxidant and hepatoprotective effects of the red ginseng essential oil in H₂O₂-treated HepG2 cells and CCl₄-treated mice**. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 2314–2330.

BAYIR, H.; KAGAN, V.E.; CLARK, R.S.; JANESKO-FELDMAN, K.; RAFIKOV, R.; HUANG, Z.; ZHANG, X.; VAGNI, V.; BILLIAR, T.R.; KOCHANNEK, P.M.; **Neuronal NOS-mediated nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in brain after experimental and human brain injury**. *Journal of Neurochemistry*, 2007 Apr; 101(1):168-81.

BERGENDI, L.; BENTES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. **Chemistry, physiology and pathology of free radicals**. *Life Sciences*. 1999;65(18-19):1865-74.

BURATTO, A.P.; CARPES,S.T.; VECCHIA,P.D.; LOSS E.M.S.; APPELT, Patrícia. **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTRIMICROBIANA EM CASTANHA-DO-PARÁ (*Bertholletia excelsa*)**. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, Campo Mourão (PR)*, v.2,n.1, p 60-65, jan/jun, 2011.

CERQUEIRA, M.D; SOUZA-NETA, L; PASSOS, M.G.V.M; LIMA E.O; ROQUE N.F; MARTINS, D; GUEDES, M.L.S; CRUZ, F.G. **Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils**. 2007 *J Braz Chem Soc* 18: 998-1003.

COLOMBO, N.B.R. **Ação dos compostos antioxidantes na redução do estresse oxidativo em modelo experimental de câncer: estudo do pequi (*Caryocar brasiliense camb*)**. Programa de Fisiopatologia Experimental, USP, São Paulo, 2013.

COSTA-HONG, V; BORTOLOTO, L.A.; JORGETTI, V; CONSOLIM-COLOMBO, F; KRIEGER, E.M; LIMA, J. J. G. **Estresse oxidativo e disfunção endotelial na doença renal crônica** Arq. Bras. Cardiol. vol.92 no.5 São Paulo May 2009.

COVAS, G.N.V.G. **Regulação do Fator de Transcrição NrF2 pelo Peróxido de Hidrogênio em células HeLa.** Universidade de Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica, 2011.

DRÖSE, S.; BRANDT, U. **Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain.** *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:145-69.

FERREIRA, A.L.A. and MATSUBARA, L.S.. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Rev. Assoc. Med. Bras.* [online]. 1997, vol.43, n.1, pp. 61-68. ISSN 0104-4230.

FOURQUET, S. et al. **Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation.** 2010, *The Journal of biological chemistry*, 285(11), pp.8463-71.

HALLIWELL, B. **Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?** *Journal of Neurochemistry*, v.97, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**, 4th edn. *Oxford University Press*, 2006.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**, 4th edn. *Oxford University Press*, New York, 2007.

IMLAY, J.A. **Pathways of oxidative damage.** *Revisão Anual de Microbiologia.* 2003;57:395-418.

KAGAN, V.E; JIANG, J; BAYIR,H; STOYANOVSKY, D.A. **Targeting nitroxides to mitochondria: location, location, location, and ...concentration: highlight commentary on "Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide".** *Free Radic Biol Med.* 2007 Aug 1;43(3):348-50. Epub 2007 Apr 1.

KANG, S. W. et al. **Mammalian peroxiredoxin isoformas can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha.** *J. Biol. Chem.* v.273, n11, p.6297-6302, 1998.

MAINES, M.D. **Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications.** *FASEB J.* 1988 Jul;2(10):2557-68

MANACH, C; SCALBERT, A; MORAND, C; RÉMÉSY, C; JIMÉNEZ, L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *The American Journal of Clinical nutrition.* 2004, May; 79(5): 727-47.

MANCARDI, D.; RIDNOUR, L.A.; THOMAS, D.D.; KATORI, T.; TOCCHETTI, C.G.; ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; PAOLOCCI, N.; WINK, D.A.; **The chemical dynamics of NO and reactive nitrogen oxides: a practical guide.** *Curr Mol Med.* 2004 Nov;4(7):723-40.

NAUGHTON, P.; FORESTI, R.; BAINS, S.K.; HOQUE, M.; GREEN C.J.; MOTTERLINI, R.; **Induction of heme oxygenase 1 by nitrosative stress. A role for nitroxyl anion.** *The Journal of Biological Chemistry.* 2002 Oct. 25; 277 (43): 40666-74. Epub 2002 Aug 22.

NETO, F.S.; IKEJIRI, A.T.; BERTOLETTO, P.R.; BERTOLETTO J.C.; TERUYA, R.; FAGUNDES,D.J.; TAHA,M.O.; **EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA AO ESTRESSE OXIDATIVO NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGO APÓS ISQUEMIA INTESTINAL.** Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras Cardiol.* 2013; [online].ahead print,PP. 0-0 DOI: 10.5935/abc.20130240.

NEUZIL, J; GEBICKI, J.M; STOCKER, R. **Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants.** *Biochem J.* 1993 Aug 1;293 (Pt 3):601-6.

NEVES, L. C. ALENCAR, S. M. CARPES, S. T. **Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*.** *Brazilian Journal of Food Technology*, VII BMCFB, junho 2009.

PONKA, P. **Cell biology of heme.** *The American Journal of the Medical Science.* 1999 Oct; 318(4):241-56

REZENDE, V. S. **Qualidade e estabilidade do óleo de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) dependendo do método de obtenção.** Instituto de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.

RIBEIRO, S. M. R. et al. **A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico.** *Bioscience Journal.* v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROMANELLO, K.S. **Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em pacientes Talassêmicos e com anemia falciforme.** São Carlos: UFSCar, 2013.

RYTER, S; KVAM, E; HEJMADI, V; TYRRELL, R.M; POURZAND, C. **Heme oxygenase activity causes transient hypersensitivity to oxidative ultraviolet A radiation that depends on release of iron from heme.** *Free Radic Biol Med.* 2000 Apr 15;28(8):1191-6.

SANTOS, D. G. **Análise da expressão da enzima heme oxigenase I durante a diferenciação eritróide.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2010.

SANTOS, D.G. et al. **Nuclear Factor (NF) kappaB polymorphism is associated with heart function in patients with heart failure.** *BMC Med Genet.* 2010 Jun 9;11:89. doi: 10.1186/1471-2350-11-89.

SANTOS, O. V.; LOPES, A. S.; AZEVEDO, G. O.; SANTOS, Â. C. **Processing of Brazil-nut flour: characterization, thermal and morphological analysis.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, p. 264-269, 2010.

SILVA, N. R.; COSTA, C. E. M. **A hiperglicemia e os mecanismos envolvidos nas disfunções vasculares do Diabetes Mellitus.** Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama, v. 12, n. 3, p. 265-270, set./dez. 2008.

SILVA, S. M. P. **Estado e políticas públicas no mercado de castanha-do-brasil no Estado do Acre: uma análise pela abordagem do desenvolvimento local.** Interfaces em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade, v. 4, n. especial, p. 103-128, 2010.

YUEN J.W; BENZIE, I.F. **Hydrogen peroxide in urine as a potential biomarker of whole body oxidative stress.** Free Radic Res. 2003 Nov;37(11):1209-13.