

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

***Baccharis trimera* protege contra o estresse oxidativo e  
toxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide no  
*Caenorhabditis elegans***

**Franciny Aparecida Paiva**

**Ouro Preto**

**2015**

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

***Baccharis trimera* protege contra o estresse oxidativo e  
toxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide no  
*Caenorhabditis elegans***

**Franciny Aparecida Paiva**

***Orientadora***

**Riva de Paula Oliveira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular

**Ouro Preto**

**2015**

P166b

Paiva, Franciny Aparecida.

Baccharis trimera protege contra o estresse oxidativo e toxicidade induzida pelo peptídeo-amilóide no *Caenorhabditis elegans* [manuscrito] / Franciny Aparecida Paiva. - 2015.

85f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Riva de Paula Oliveira.

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

Área de Concentração: Biologia Molecular.

1. Antioxidantes. 2. *Baccharis trimera*. 3. *Caenorhabditis elegans*. 4. Estresse oxidativo. 5. Alzheimer, Doença de. I. Oliveira, Riva de Paula. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.1:615.32

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)

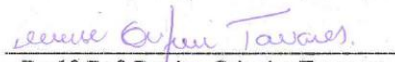


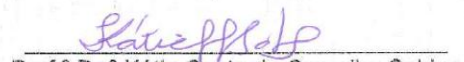
**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:**


**“O efeito antioxidante e neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de Carqueja no modelo *Caenorhabditis elegans*”**

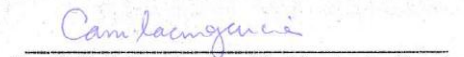
Aos dois dias do mês de março de 2015, às 8:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Franciny Aparecida Paiva**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... aprovar ..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Crispim Tavares  
Examinadora (Universidade de Franca)

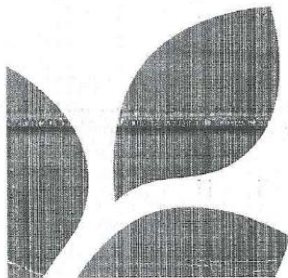
  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kátia Costa de Carvalho Sabino  
Examinadora (UERJ)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Caldeira Costa  
Examinadora (UFOP)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Camila Carrião Machado Garcia  
Examinadora (UFOP)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Riva de Paula Oliveira  
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 02/03/2015



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil  
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Riva de Paula Oliveira, ao professor Eric Boulanger e a todos os membros da equipe da Riva pela convivência, paciência e aprendizado que me proporcionaram um grande crescimento profissional e pessoal.

A todos do Laboratório de Genética Bioquímica e dos demais laboratórios da UFOP que sempre me auxiliaram quando necessário, especialmente o Laboratório de Multiusuários.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da UFOP.

Ao apoio financeiro da FAPEMIG, CAPES e UFOP.

Aos meus familiares, amigos da BP e todos que sempre me apoiaram e confiaram na minha capacidade.

## RESUMO

Uma planta muito utilizada na medicina popular é a *Baccharis trimera* (*B. trimera*), conhecida como Carqueja, planta nativa encontrada em toda a América do Sul, rica em antioxidantes tais como os ésteres do ácido quínico e os flavonóides nepetina, quercetina e isoquercetina. Vários estudos têm mostrado que a *B. trimera* tem atividade antioxidante *in vitro*, no entanto, os efeitos antioxidantes desta planta ainda foram pouco explorados *in vivo*. Neste projeto, nós usamos o organismo modelo *Caenorhabditis elegans* para investigar o potencial antioxidante *in vivo* do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) e seus possíveis mecanismos subjacentes, além de investigar se o EHB possui efeito protetor em um modelo *C. elegans* para a doença de Alzheimer. A suplementação com 50 mg/mL de EHB não alterou a longevidade, a reprodução, o desenvolvimento ou o comportamento alimentar do *C. elegans*. O EHB inibiu o crescimento microbiano, mas esta propriedade bacteriostática não influenciou no aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo EHB. Os efeitos benéficos do EHB foram independentes das vias de sinalização testadas sugerindo que o aumento observado na resistência ao estresse oxidativo possa ser através de um mecanismo de ação direto, já que o EHB foi capaz de diminuir a produção de ROS e a expressão de *sod-3* e *gcs-1*. O EHB aliviou a paralisia induzida pelo  $\beta$ -amilóide em um modelo de *C. elegans* para doença de Alzheimer. Nossos resultados sugerem que o possível efeito neuroprotetor do EHB contra o peptídeo A $\beta$ 1-42 é, em parte pela ação antioxidante do EHB como também um resultado de um aumento da homeostase protéica, já que o EHB aumentou a atividade do proteassoma e expressão gênica de duas proteínas de choque térmico. Em conjunto, todos os resultados desse trabalho sugerem um uso potencial neuroprotetor para *B. trimera*, apoiando a ideia de que o uso de antioxidantes na dieta é uma abordagem promissora para aumentar os sistemas de defesa contra o estresse e neurodegeneração.

## ABSTRACT

A plant widely used in folk medicine is *Baccharis trimera* (*B. trimera*), known like Carqueja, native plant found throughout South America, rich in antioxidants such as acid quinic esters and nepetin, quercetin and isoquercetin flavonoids. Several studies have shown that *B. trimera* has antioxidant activity *in vitro*, however, the antioxidant effects of this plant still been little explored *in vivo*. In this project, we used the *Caenorhabditis elegans* to investigate the antioxidant potential of *B. trimera* Hydroalcoholic Extract (EHB) *in vivo* and its possible underlying mechanisms, and investigate whether EHB has protective effect in *C. elegans* model for Alzheimer's disease. Supplementation with EHB 50 mg/mL did not affect the longevity, reproduction, development feeding behavior of *C. elegans*. EHB inhibited microbial growth, but this bacteriostatic property did not affect the increased resistance to oxidative stress caused by the EHB. The EHB beneficial effects were independent of the signaling pathways here tested suggesting that the increase in oxidative stress resistance may be through a direct mechanism of action, since the EHB was capable of reducing ROS production and *sod-3* and *gcs-1* expression. EHB delayed paralysis induced by  $\beta$ -amyloid in a *C. elegans* model for Alzheimer's disease. Our results suggest that the possible neuroprotective effect of EHB against A $\beta$ 1-42-peptide is partly antioxidant activity of the EHB as well as a result of an increase in protein homeostasis, since the EHB increased proteasome activity and two heat shock proteins gene expression. Together, all the results of this study suggest a potential neuroprotective use for *B. trimera*, supporting the idea that the use of antioxidants in the diet is a promising approach to increase the defense mechanisms against stress and neurodegeneration.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Estresse Oxidativo	1
1.2 Antioxidantes Exógenos e Endógenos	2
1.3 Controle da Expressão Gênica das Enzimas Antioxidantes em Mamíferos	5
1.3.1 Proteínas Nrf2 (Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2)	5
1.3.2 Proteínas FoxO (Forkhead Box O)	7
1.4 Plantas Medicinais e Fitoquímicos	9
1.4.1 Mecanismo de Combate às ERO dos Fitoquímicos	11
1.4.2 Fitoquímicos e a Doença de Alzheimer	13
1.4.3 Fitoquímicos e Homeostase Proteica na Doença de Alzheimer	13
1.5 Propriedades Biológicas da <i>B. trimera</i>	16
1.6 O <i>C. elegans</i> como um Organismo Modelo Biosensor	21
1.7 Regulação da Resposta de Detoxificação e Resistência ao Estresse no <i>C. elegans</i>	24
1.8 <i>C. elegans</i> como Modelo para Estudo da Doença de Alzheimer	26
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>30</b>
3.1 Cepas e Linhagens	30
3.2 Crescimento e Manutenção do <i>C. elegans</i>	30
3.3 Sincronização Cronológica do <i>C. elegans</i>	30
3.4 Extrato de <i>B. trimera</i>	31
3.4.1 Coleta do Material Botânico	31
3.4.2 Preparo do Extrato Hidroalcoólico de <i>B. trimera</i> (EHB)	31
3.5 Caracterização do Extrato <i>in vitro</i>	32
3.5.1 Dosagem de Polifenóis Totais	32
3.5.2 Atividade Sequestradora de Radicais Livres	32
3.6 Preparo das Placas NGM contendo EHB	33
3.6.1 Preparo das Placas NGM contendo EHB para os Experimentos de RNAi	33
3.7 Ensaio de Crescimento Bacteriano	34
3.8 Tamanho Corporal e Progênie	34
	viii



3.9 Batimento Faríngeo	35
3.10 Ensaio de Longevidade	35
3.11 Ensaio de Resistência ao Estresse Oxidativo	36
3.12 Quantificação de ERO Intracelular no <i>C. elegans</i>	36
3.13 Análise de Genes Repórteres	36
3.14 Ensaio de Paralisia Induzida pelo Peptídeo $\beta$ -amilóide	37
3.15 Coloração pelo Vermelho Nilo	38
3.16 Atividade do Proteassoma	38
3.17 Análise Estatística	39
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>40</b>
4.1 Caracterização do EHB	40
4.2 Análise da Sobrevivência do <i>C. elegans</i> Tratado com EHB em Condições Normais	40
4.3 Análise do Efeito do Tratamento com EHB na Sobrevivência do <i>C. elegans</i> em Condições de Estresse Oxidativo	42
4.4 Avaliação do Efeito do EHB no Crescimento da <i>E. coli</i> OP50	42
4.5 Análise do Efeito do Tratamento com EHB na Sobrevivência do <i>C. elegans</i> Alimentado com Bactéria Morta em Condições de Estresse Oxidativo	46
4.6 Análise do Efeito do EHB sobre o Tamanho Corporal e Progênie	46
4.7 Avaliação do Efeito do EHB sobre o Batimento Faríngeo	46
4.8 Análise do Efeito do EHB Sobre a Produção Intracelular de ERO	50
4.9 Análise do Efeito do EHB sobre a Expressão Gênica	50
4.10 Avaliação da Participação de Diferentes Vias de Sinalização sobre o Aumento da Resistência ao Estresse Promovido pelo EHB	53
4.11 Avaliação da Paralisia Induzida pelo Peptídeo $\beta$ -amilóide	55
4.12 Avaliação da Atividade do Proteassoma	55
4.13 Avaliação da Expressão de Proteínas de Choque Térmico	58
4.14 Quantificação dos Depósitos do Corante Vermelho Nilo nas LROs	58
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>61</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>69</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo esquemático simplificado das reações catalisadas por enzimas de detoxificação de fase 2. 4
- Figura 2.** Ciclo de vida do *C. elegans* a 22°C. 22
- Figura 3.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na sobrevivência do *C. elegans* sob condições padrões de laboratório. 43
- Figura 4.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na sobrevivência do *C. elegans* sob condições de estresse. 44
- Figura 5.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) no crescimento da *E. coli*. 45
- Figura 6.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse oxidativo de *C. elegans* alimentado com bactéria tratado com kanamicina. 47
- Figura 7.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) no crescimento e na reprodução do *C. elegans*. 48
- Figura 8.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) no batimento faríngeo do *C. elegans*. 49
- Figure 9.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na produção deERO no *C. elegans*. 51
- Figure 10.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na expressão de *sod-3::GFP*, *gcs-1::GFP*, e *gst-4::GFP*. 52
- Figura 11.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) em um modelo transgênico de *C. elegans* para doença de Alzheimer. 56
- Figura 12.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na homeostase proteica. 57
- Figura 13.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na expressão de proteínas de choque térmico. 59
- Figura 14.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) no depósito do corante vermelho Nilo. 60

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Capacidade antioxidante do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) e Trolox *in vitro* pelo ensaio do DPPH. 40

**Tabela 2.** Efeito do tratamento com o Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na sobrevivência de *C. elegans* mutantes *fem-1* a 25°C. 43

**Tabela 3.** Efeito do tratamento com Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* tratados com OP50. 44

**Tabela 4.** Efeito do tratamento com Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* tratados com OP50 morta. 47

**Tabela 5.** Efeito do tratamento com 50 mg/mL de Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* tipo selvagem e mutantes. 54

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK - AMP activated protein kinase

ARE - Elemento de resposta antioxidante

A $\beta$  - Peptídeo  $\beta$ -amilóide

CAT - Catalase

CK-2 - Caseína quinase-2

Cul3- Cullin 3

CYP - Citocromo P450

DA - Doença de Alzheimer

DAF-16 - Abnormal DAuer Formation

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DPPH - 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

EHB - Extrato Hidroalcoólico de B. trimera

EpRE - Elemento de resposta à eletrófilo

ERK - Extracellular signal-related kinase

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FoxO - Forkhead Box O

G-6P - Glicose 6-fosfato

GCS -  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase

GCS-1 - Glutamil cisteína sintetase 1

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

GRP78 -Glicose-78

GSH - Glutaciona reduzida

GSK-3 -Glicogênio sintetase quinase -

GSK3 $\beta$  – Glicogênio sintase quinase-3 $\beta$

GSSG - Glutaciona oxidada

GST - Glutaciona S-transferase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HO-1 - Heme oxigenase-1

HSPs - Proteínas de choque térmico

IIS - Via de sinalização da insulina  
JNK - c-jun N-terminal kinase  
Kan - Kanamicina  
Keap1- Kelch-like ECH-associated protein 1  
LROs - Organelas relacionadas ao lisossoma  
MAPK - Proteínas ativadas por mitógenos  
NAD(H) - Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADP(H) - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NQO1 - NAD(P) H: quinona oxidoreductase-1  
Nrf2 - Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2  
 $O_2^-$  - Radical superóxido  
OH $^-$  - Radical hidroxila  
PERK - Quinase do retículo endoplasmático PKR  
PI3K/Akt - Fosfatidilinositol 3- quinase  
PKC - Proteína quinase C  
RE - Retículo endoplasmático  
RNA – Ácido Ribonucléico  
RNAi - RNA de interferência  
SDRs - desidrogenases/redutases de cadeia curta  
SGK - Serum and glucocorticoid regulated kinase  
SKN-1 - SkiNhead  
SOD - Superóxido dismutase  
*t*-BOOH - tert-butilhidroperóxido  
UPR - Resposta a proteínas desenoveladas

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Estresse Oxidativo

Os organismos vivos estão constantemente submetidos a estresse causado por espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) que são formados a partir do metabolismo de vários compostos. Os danos celulares causados pelo estresse oxidativo têm sido implicado em condições que incluem a diabetes, aterosclerose, muitas síndromes neurodegenerativas e envelhecimento (DROGE, 2002).

As ERO podem ser geradas de forma endógena durante o metabolismo celular, ou de forma exógena, como por exposição a drogas e compostos estressores (COOKE *et al.*, 2003). O oxigênio é essencial para muitos organismos vivos para a produção da energia utilizada como combustível durante os processos biológicos. No entanto, aproximadamente 1 a 3% do oxigênio consumido pelo corpo é convertido em ERO (SOHAL; WEINDRUCH, 1996). Três das maiores ERO (radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) são subprodutos metabólicos normais que são formados continuamente pela mitocôndria de células (CASTRO; FREEMAN, 2001; LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2004). Outras fontes intracelulares significante de ERO incluem as enzimas do citocromo P450 microsomal, flavoproteínas oxidases e enzimas peroxissomais envolvidas no metabolismo de ácidos graxos (CASTRO; FREEMAN, 2001). O excesso de ERO danifica fisiologicamente importantes macromoléculas celulares como lipídios, proteínas e DNA (FINKEL; HOLBROOK, 2000) e leva à perda da integridade e funcionalidade celular.

Embora o excesso de espécies reativas possa ser considerado tóxico, concentrações baixas a moderadas de ERO/ERN são essenciais para o metabolismo normal das células. Por exemplo, o radical superóxido e óxido nítrico, são responsáveis por respostas celulares fisiológicas na defesa a agentes infecciosos, na manutenção do tônus vascular, no controle da ventilação pulmonar, na produção de eritropoetina, na ativação de diversas vias de sinalização celulares, e na indução da resposta a mitógenos (VALKO *et al.*, 2007). Este reconhecido caráter “dupla face” das ERO tem contribuído para o estabelecimento de uma redefinição de estresse oxidativo clássico “desequilíbrio

de pró-oxidantes e antioxidantes” para um conceito mais contemporâneo sobre uma “ruptura do controle e sinalização redox” (JONES, 2006).

## 1.2 Antioxidantes Exógenos e Endógenos

Essencialmente todos os organismos vivos possuem uma variedade de moléculas e mecanismos que previnem ou reduzem os danos causados pelas ERO. A homeostase do oxigênio, ou seja, o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, é mantido por reações de oxidação (redox) envolvendo a transferência de elétrons entre duas espécies químicas (SOHAL; WEINDRUCH, 1996).

Antioxidantes são substâncias que atacam e neutralizam as ERO prevenindo os danos causados por elas. Antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: exógenos e endógenos.

Os antioxidantes exógenos são obtidos de fontes dietéticas. Antioxidantes da dieta são classificados em várias classes, dos quais os polifenóis é a maior. As outras classes incluem vitaminas, carotenóides, compostos organosulfurados, minerais e cofatores que desempenham um papel importante na manutenção da saúde humana (RATNAM *et al.*, 2006). Sabe-se que estes antioxidantes são capazes de eliminar diretamente as ERO, uma propriedade que pode ser atribuída principalmente aos grupos de hidroxila presentes em suas estruturas. Eles podem também agir indiretamente através da ativação de diferentes vias de sinalização de resposta ao estresse (SI; LIU, 2014).

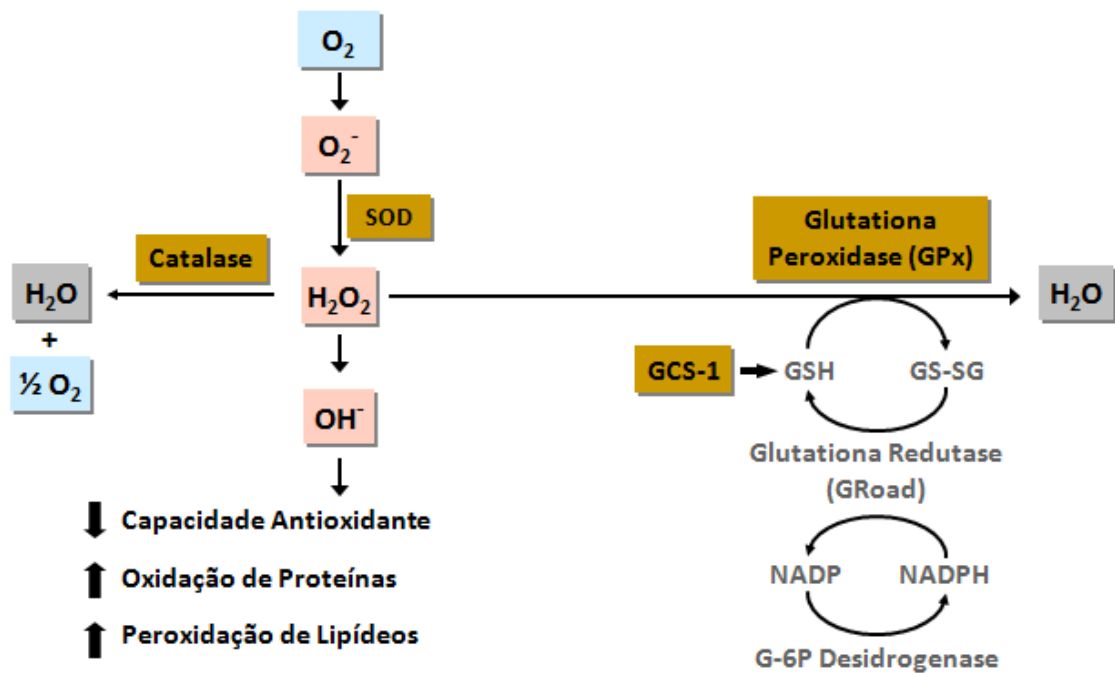
Os antioxidantes endógenos são produzidos por nossas células e fazem parte de um complexo sistema de detoxificação de três fases altamente conservado entre eucariotos (XU; LI; KONG, 2005; SARKADI *et al.*, 2006). Durante a fase 1, endobióticos lipofílicos ou xenobióticos são solubilizados através da modificação por enzimas, tais como a citocromo P450 (CYP) e desidrogenases/reduções de cadeia curta (SDRs). Estas enzimas usam nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) como cofatores para adicionar um grupo reativo, como hidroxila, por exemplo. Este processo permite que estes compostos sejam excretados, mas pode também produzir compostos reativos nocivos (SARKADI

*et al.*, 2006). Se estas moléculas reativas não forem metabolizadas pelas enzimas de fase 2, elas podem causar danos a proteínas, RNA e DNA (VERMEULEN *et al.*, 1996).

As enzimas de fase 2 além de defenderem as células contra compostos gerados na fase 1 também agem sobre ERO produzidas endogenamente. Elas englobam um diverso grupo de enzimas que metabolizam radicais livres, reparam estruturas celulares ou conjugam diretamente xenobióticos e lipídios peroxidados (SARKADI *et al.*, 2006). As enzimas de fase 2 de detoxificação são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST),  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase (GCS), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR). SOD e CAT estão entre os mais potentes antioxidantes conhecidos na natureza (SI; LIU, 2014; RATNAM *et al.*, 2006). SOD catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e isto é difundido na natureza em organismos eucariotos e procariotos. CAT protege as células catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água sem produção de radicais livres (McCORD, 1986; SIES, 1993; RATNAM *et al.*, 2006). A GCS é uma enzima chave para a síntese de glutathione, um tripeptídeo (g-L-glutamyl-L-cisteinil-glicina) que existe nos organismos nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (GIPP; BAILEY; MULCAHY, 1995; HAMILTON, 2003; MA, 2010). As GSTs catalisam a conjugação de GSH ao centro eletrofílico de uma variedade de substratos. A glutathione peroxidase catalisa a reação da glutathione reduzida (GSH) com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Outra enzima que age conjuntamente com a glutathione peroxidase é a enzima glutathione reductase (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de radicais livres, porém é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (Figura 1) (LU, 2000; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

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





**Figura 1.** Modelo esquemático simplificado das reações catalisadas por enzimas de detoxificação de fase 2. SOD, superóxido dismutase; GCS-1, glutamil cisteína sintetase 1; GSH, glutaciona reduzida; GS-SG, glutaciona oxidada; NADP(H), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; G-6P, glicose 6-fosfato;  $O_2^-$ , radical superóxido;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio;  $OH^-$ , radical hidroxila. Quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade destas enzimas de remover estes radicais, o acúmulo de ERO leva a uma menor capacidade antioxidante da célula, aumento da oxidação de proteínas e peroxidação de lipídeos.

### **1.3 Controle da Expressão Gênica das Enzimas Antioxidantes em Mamíferos**

A condição de estresse oxidativo na célula ativa várias respostas fisiológicas e patológicas. Estas respostas, em última análise, são capazes de modular o perfil transcricional de forma a influenciar o destino da célula e a progressão de uma doença. Nas últimas décadas, um número de fatores de transcrição e de vias de sinalização foram identificados pelo seu papel crítico na resposta ao estresse oxidativo (MA, 2010). Dentre estes fatores de transcrição, podemos citar as proteínas Nrf e FoxO.

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

Nrf2 (Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2) é um fator de transcrição do tipo zíper de leucina (bZIP), é essencial para a indução coordenada de genes que codificam muitas enzimas de resposta ao estresse ou citoprotetivas e proteínas relacionadas, tais como o NAD(P) H: quinona oxidoredutase-1 (NQO1), SOD, GST, GPx, heme oxigenase-1 (HO-1), glutamato cisteína (GCL), CAT e tioredoxina (AN; BLACKWELL, 2003; DAS; KIM; KEUM, 2013).

A atividade de Nrf2 é fortemente regulada no citosol por Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Sob condições normais, Nrf2 é constantemente poliubiquitinado e degradado pelo proteossoma de uma maneira dependente de Keap1. Keap1 também se associa com Cullin 3 (Cul3) e ubiquitina ligase E3, em que Keap1 serve como um adaptador de substrato. Keap1-Cul3 ubiquitina ligase E3 poliubiquitina Nrf2 para que seja degradado. Keap1 é uma proteína rica em tióis e possui múltiplas cisteínas reativas cujos resíduos vizinhos são, frequentemente, aminoácidos básicos. Os tióis reativos são excelentes alvos de eletrófilos e, de fato, vários reagentes eletrofílicos tem sido mostrado modificar diretamente os tióis. Modificação de Keap1 prejudica a integridade estrutural do complexo Keap1-Cul3 ligase E3, resultando em declínio da atividade de ubiquitinação e, assim, facilitando o acúmulo de Nrf2 (TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011). Então, sob condições de estresse oxidativo ou eletrofílico, Nrf2 desliga-se de Keap1 e transloca-se para o núcleo. Após a migração para o núcleo, sofre uma combinação heterodimérica com outros fatores de transcrição, como as pequenas proteínas Maf e liga-se à região promotora, denominada elemento de resposta antioxidante (ARE) ou elemento de resposta à eletrófilo (EpRE), de genes que

codificam enzimas antioxidantes/detoxicantes (SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008; TULLET *et al.*, 2008). Assim, Keap1 atua como um sensor que traduz sinais eletrofílicos para ativação transcricional (TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011; KEUM, 2012).

Já foi descrito que Nrf2 pode ser ativado por diferentes vias de sinalização, como proteínas ativadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/Akt), proteína quinase C (PKC) e caseína quinase-2 (CK-2). Por outro lado, a glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) fosforila e regula negativamente a sinalização Nrf2 (SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008).

MAPK é uma das principais vias de sinalização, que transmite vários sinais extracelulares para dentro do núcleo através de uma cascata de fosforilação que é responsável pela ativação da expressão gênica dependente de ARE. A família MAPK consiste de três membros: ERK (extracellular signal-related kinase), JNK (c-jun N-terminal kinase), e p38 MAPK. MAPK é fosforilada e ativada por quinases que estão acima, por exemplo, MAPK quinase (MAPKK) e MAPKK quinase (MAPKKK). Após ativação, MAPK é fosforilada em uma treonina (T) e tirosina (Y), que existe no motivo TXY do loop de ativação, e o aminoácido central (X) é um definido motivo de aminoácido individual das MAPKs: ácido glutamínico (E) para ERK, prolina (P) para JNK e glicina (G) para p38 MAPK (DAS; KIM; KEUM, 2013). A via JNK está envolvida na regulação de várias respostas celulares incluindo transcrição, sobrevivência e apoptose sobre diversos estímulos. Condições de estresse oxidativo, o que implica também geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luz UV, choque térmico, além de acúmulo de beta amiloide no cérebro de diferentes modelos de doença de Alzheimer, são conhecidos por estimular a via de sinalização JNK (YIN; JIANG; CADENAS, 2013). Sabe-se que a via da ERK pode ser ativada em resposta a fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, estresse oxidativo e injúria isquêmica (CHENG; ALBERTS; LI, 2013). Finalmente, a via de sinalização da p38 MAPK é uma importante mediadora de sinais que respondem a uma variedade de estressores extracelulares como radiação UV, choque osótico, hipoxia, citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo. A via p38 MAPK influencia o balanço redox, determina a sobrevivência celular, diferencial terminal, proliferação e senescência (TORMOS *et al.*, 2013).

Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é outra via de sinalização intracelular que está implicada na regulação da expressão gênica dependente de Nrf2/ARE. Estudos anteriores têm demonstrado que PI3K e a quinase abaixo Ser/Thr quinase (Akt), pode regular positivamente a expressão dependente de ARE. Embora exista falta de evidências se PI3K e Akt podem fosforilar diretamente Keap1 ou Nrf2 e modular a expressão dependente de ARE, sabe-se que glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) pode fosforilar diretamente e suprimir a atividade de Nrf2 causando sua exclusão nuclear (SALAZAR *et al.*, 2006). GSK3 $\beta$ , alvo de Akt, é ativado em resposta a fatores de crescimento e oxidantes externos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como a atividade de GSK3 $\beta$  é negativamente regulada por Akt, é possível que a ativação de Akt mediada por PI3K pode causar uma fosforilação e inativação de GSK3 $\beta$ , assim promovendo translocação e ativação de Nrf2, graças à atenuação da regulação negativa mediada por GSK3 $\beta$  (DAS; KIM; KEUM, 2013).

Em adição às cascatas da MAPK e PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ , proteína quinase C (PKC) e a quinase do retículo endoplasmático PKR (PERK) são outras quinases intracelular que fosforilam diretamente Nrf2 e modulam a expressão dependente de ARE. PKC fosforila diretamente Nrf2 no resíduo serina 40 e ativa a ativação de ARE mediada por Nrf2 pela perturbação na interação entre as proteínas Nrf2 e Keap1. PERK pode fosforilar diretamente Nrf2 após o acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático, embora o exato resíduo de fosforilação ainda não tenha sido identificado. Outros estudos ainda fornecem interessantes resultados que o tratamento com tert-butilhidroquinona (tBHQ) leva à fosforilação de Nrf2 mediada pela caseína quinase 2 (CK2-), assim facilitando sua translocação nuclear e ativação da expressão gênica dependente de ARE (DAS; KIM; KEUM, 2013).

### **1.3.2 Proteínas FoxO (Forkhead Box O)**

Quatro principais membros do FoxO de mamíferos- subfamília - FoxO1, FoxO3a, FoxO4 e Fox6 - tem sido descrito (LANDIS; MURPHY, 2010; YEN; NARASIMHAN; TISSENBAUM, 2011). Embora eles pareçam se ligar a um sítio comum no DNA, FoxO6 é principalmente específico para neurônios, enquanto os outros três membros da família são expressos em vários tecidos. Os membros da família FoxO estão ligados à

sobrevivência celular, proliferação celular e resposta de reparo ao DNA. Entre eles, FoxO3a tem sido extensivamente estudado como uma proteína crucial que está envolvida na regulação de várias funções celulares essenciais. Em geral, FoxO3a suprime a progressão do ciclo celular e promove a morte celular, sendo um importante alvo para inibir a progressão de células de câncer. Estudos recentes têm descoberto outras funções de FoxO3a, como estresse oxidativo e longevidade. Alteração em FoxO3a está também associada a diferentes tipos de doenças. Interessantemente, FoxO3a aumenta a autofagia para proteger as células de estresses ambientais, desempenhando um importante papel na manutenção da homeostase celular (NHO; HERGERT, 2014).

FoxO3a é regulado por modificações pós-traducionais como fosforilação, acetilação e ubiquitinação, cada uma das quais afeta a atividade transcricional da proteína FoxO3a (MA, 2010; YEN; NARASIMHAN; TISSENBAUM, 2011). A atividade de FoxO3a é cuidadosamente regulada por fosforilação. A fosforilação de FoxO3a por várias quinases é bem estabelecido. Dentre elas, a proteína quinase B (Akt) é a mais importante quinase que fosforila diretamente FoxO. No caso da FoxO3a, os resíduos treonina 32, serina 253 e serina 315 são fosforilados por Akt e, em particular, a fosforilação do resíduo serina 253 é crucial para a regulação da translocação núcleo/citoplasma de FoxO3a. Por exemplo, quando células são cultivadas na presença de fatores de crescimento ou insulina, FoxO3a é fosforilado por Akt e localiza-se principalmente no citoplasma, o que previne sua atividade transcricional. A fosforilação de FoxO3a por Akt facilita a interação de FoxO3a com a proteína de exportação nuclear 14-3-3, prevenindo a localização nuclear de FoxO3a. Além disso, a fosforilação de FoxO3a por Akt promove uma associação com uma ubiquitina ligase E3, subsequentemente poliubiquitinação de FoxO3a, que facilita a degradação de FoxO3a pelo proteossoma. Então, a ativação de Akt é crítico para a regulação de FoxO3a. No entanto, em alguns tumores, FoxO3a permanece no citoplasma mesmo na ausência da atividade de Akt. Tem sido mostrado que I $\kappa$ B quinase (IKK) fosforila FoxO3a na serina 644, desse modo inibindo a atividade transcricional de uma maneira Akt independente. A fosforilação de FoxO3a por IKK também leva a sua localização no citoplasma, embora o mecanismo subjacente de exportação não seja entendido. A via da insulina/IGF-1 e a via de sinalização dependente de integrina ativa Akt via supressão do

PTEN que fosforila FoxO3a, tornando-o funcionalmente inativo. Em contraste, FoxO3a está localizado no núcleo para ativar seus genes alvos quando fatores de crescimento ou soro estão escassos. Adicionalmente, SGK (serum and glucocorticoid regulated kinase), CK1 (casein kinase 1), DYRK1A (dual specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A), JNK (janus N-terminal kinase), MAPKs (mitogen-activated protein kinases), IKK $\beta$  (IkappaB kinase), MST1 (mammalian sterile 20-like kinase 1) e AMPK (AMP activated protein kinase) também são conhecidos regular FoxO3a e outros membros da família por fosforilação de múltiplos resíduos. Interessantemente, SGK1 é transcricionalmente ativado em resposta a uma variedade de estímulos externos, incluindo fatores de crescimento. SGK1 fosforila o resíduo de serina 253, que ativa sua localização no citoplasma, portanto, inibindo sua ação. Em contraste, AMPK ativa FoxO3a. Seis resíduos de serina/treonina (T179, S399, S413, S555, S588 e S626) em FoxO3a de mamíferos são fosforilados por AMPK. Mutação nestes resíduos de fosforilação para alanina prejudica severamente sua função, ainda que não altere sua capacidade de se ligar a sequências cognatas ou para participar da translocação núcleo-citoplasma dependente de sinais externos. Do mesmo modo, JNK também fosforila FoxO3a, aumentando sua localização nuclear que subsequentemente aumenta sua atividade transcricional (NHO; HERGERT, 2014).

#### **1.4 Plantas Medicinais e Fitoquímicos**

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

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

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

Os compostos fenólicos são largamente encontrados em várias plantas como açaí, kiwi, chá verde, cacau e vinho tinto e apresentam várias funções fisiológicas e farmacológicas (SPADA *et al.*, 2009; IWASAWA *et al.*, 2011; NICOD *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que os compostos fenólicos possuem poderosos efeitos em respostas biológicas por eliminar as ERO e pela ativação de vias de sinalização (BONOMO *et al.*, 2014; KWEON *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas caracterizados por no mínimo um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. São geralmente produzidos como mecanismos de defesa contra patógenos e organismos causadores de doenças, como proteção contra a radiação ultravioleta em excesso e como atrativos para os polinizadores. Compostos fenólicos complexos também são componentes estruturais importantes de plantas (OGAH *et al.*, 2014). Dentre os fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (ANGELO; JORGE, 2007).

Os flavonóides tornaram-se uma classe de destaque, dentre os polifenóis de maior interesse para a saúde, por seus efeitos protetores contra muitas doenças, principalmente doenças cardiovasculares e câncer (WALLE, 2004). Os flavonóides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular e possuem em sua estrutura química dois anéis aromáticos, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, organizados na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (AHERNE; O'BRIEN, 2002). Os flavonóides são encontrados em diversos alimentos de origem vegetal, como maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, açaí, cacau, chá e vinho tinto sendo, portanto, importantes constituintes da dieta humana (YOU DIM; JOSEPH, 2001).

Já os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças

cardiovasculares e outras doenças (SOARES, 2002). Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos incluem os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico como os mais comuns (ANGELO; JORGE, 2007).

#### **1.4.1 Mecanismo de Combate às ERO dos Fitoquímicos**

Muitos dos efeitos fisiológicos dos compostos fenólicos têm sido atribuídos à sua capacidade antioxidante direta. Antioxidantes diretos, tais como glutathione, tocoferol, ácido ascórbico e carotenóides, são substâncias que podem participar diretamente em processos fisiológicos, bioquímicos e celulares neutralizando o radical livre ou prevenindo as reações químicas deflagradas pelos radicais livres (SHARONI *et al.*, 2004; MASELLA *et al.*, 2005). Além destas características, antioxidantes diretos compartilham outras características: eles são consumidos ou quimicamente modificados no processo de ação antioxidantes e devem ser repostos ou regenerados após sua ação (ENIO, 2003). O efeito antioxidante direto dos compostos fenólicos se deve à capacidade destes compostos em neutralizar os radicais livres (ânion superóxido, radicais hidroxilas e peroxilas) ou quelar íons metálicos (cobre e ferro), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo por doarem átomos de hidrogênio às espécies, estabilizando-as (ENIO, 2003; SOARES, 2002).

Em adição a estes efeitos sob as espécies reativas, tem sido descrito que os compostos fenólicos também podem atuar como antioxidantes indiretos (HU *et al.*, 2006; JUGE; MITHEN; TRAKA, 2007). Os antioxidantes indiretos, ao contrário dos diretos, não são capazes de participar diretamente em nenhuma reação de redox. O modo de atuação destes compostos é a ativação transcricional das enzimas de detoxificação da fase 2. Portanto, eles agem cataliticamente, não são consumidos durante sua ação antioxidante e possuem uma meia vida longa que, conseqüentemente, aumentam a capacidade antioxidante da célula (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2002). Várias classes de indutores da fase 2 já foram descritas tais como difenóis, isotiocianatos, metais pesados e peróxido de hidrogênio, entre outros. Evidências



mostram que os flavonóides e os ácidos fenólicos regulam a atividade de enzimas antioxidantes, modulam receptores nucleares, atuam sobre a expressão gênica e vias de sinalização celular (MOSKAUG *et al.*, 2004; KWEON, 2006). A indução de enzimas da fase 2 geralmente aumenta a atividade de GCS-1, a enzima limitante da síntese da glutatona, o que consequentemente aumenta os níveis da glutatona reduzida (GSH) nos tecidos (MULCAHY *et al.*, 1997). Já foi demonstrado que vários compostos fitoquímicos, como o isotiocianato presente no brócolis, também são potentes indutores de Nrf2 e das enzimas de detoxificação da fase 2 aumentando a capacidade antioxidante da célula (OSBURN; KENSLER, 2008). Esta ativação aumenta a proteção contra processos inflamatórios, estresse oxidativo e desenvolvimento de tumores (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2005). Evidências *in vivo* mostraram que camundongos deficientes para *Nrf2* não respondem à proteção dos antioxidantes e são mais susceptíveis a carcinogênese (FAHEY *et al.*, 2002; RAMOS-GOMES *et al.*, 2001).

Sabe-se que fitoquímicos da dieta, incluindo os polifenóis, podem atuar de várias formas que, consequentemente, levam à localização nuclear de Nrf2. Curcumina e o ester feniletil ácido caféico (caffeic acid phenylethyl ester) podem inativar o complexo Nrf2-Keap1. Alternativamente, os fitoquímicos, por exemplo, alguns componentes de chás verdes como o galato epilocatequina, kaempferol, genisteína e curcumina, podem ativar as quinases de diferentes vias de sinalização - p38 MAPK, PKC, ERK, JNK, PI3K - causando a liberação de Nrf2 do complexo inibitório. Adicionalmente, o sulforofano, fitoquímico encontrado em vegetais crucíferos, pode inibir a degradação proteolítica de Nrf2 pelo proteassoma e prolongar seu tempo de vida médio (SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008). Nrf2 ativado transloca para o núcleo onde interage com pequenas proteínas da família Maf, liga-se à região ARE, permitindo a transcrição de genes alvos incluindo antioxidantes e enzimas de fase 2 (BENSASSON *et al.*, 2008). FoxO também pode ser ativado por fitoquímicos, como, por exemplo, o resveratrol e a quercetina, resultando em ativação de genes envolvidos no metabolismo energético e em vias antioxidante (KAMPKÖTER *et al.*, 2007).

### **1.4.2 Fitoquímicos e a Doença de Alzheimer**

O estresse oxidativo desempenha um papel significativo na patogênese da doença de Alzheimer (DA), doença neurodegenerativa muito comum em idosos. O cérebro é mais vulnerável do que outros órgãos ao estresse oxidativo, e a maioria dos componentes dos neurônios (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) pode ser oxidado na DA, devido à disfunção mitocondrial, o aumento dos níveis de metal, inflamação, e depósito de peptídeos  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) (CHEN; ZHONG, 2014). As características neuropatológicas da DA no cérebro incluem placas senis, emaranhados neurofibrilares e perda de células neuronais. Estudos bioquímicos revelam que as placas senis e os emaranhados neurofibrilares são compostos principalmente pela proteína  $A\beta$  e proteínas tau - proteína associada ao microtúbulo - altamente fosforilada, respectivamente (TAMAOKA, 2013). O estresse oxidativo participa no desenvolvimento da DA pela promoção de deposição do peptídeo  $A\beta$ , hiperfosforilação da tau, e subsequente perda das sinapses e neurônios (GRAY, 2014). A relação entre o estresse oxidativo e a DA sugere que o estresse oxidativo é parte essencial para o processo patológico e a utilização dos antioxidantes pode ser eficiente para o tratamento da DA (CHEN; ZHONG, 2014).

Estudos prévios têm mostrado que os compostos fenólicos previnem danos em células neuronais, sugerindo que estes compostos são eficientes como agentes neuroprotetores. Walker *et al.* (2014) trataram camundongos com chá verde de catequina (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) e observaram uma diminuição nos níveis do peptídeo  $A\beta$ 1-42 no córtex e hipocampo. Os compostos fenólicos miricetina (Myr) e ácido rosmarínico (RA) inibiram a agregação do  $A\beta$  *in vitro* e *in vivo* (ONO *et al.*, 2012). O ácido caféico isolado da fração butanólica do extrato de *Erigeron annuus*, mostrou atividade antioxidante *in vitro* e protegeu células neuronais PC12 contra a citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo (JEONG *et al.*, 2011).

### **1.4.3 Fitoquímicos e Homeostase Proteica na Doença de Alzheimer**

Pesquisas recentes também sugerem que um declínio relacionado com a idade na capacidade de manutenção da homeostase proteica permite a manifestação de várias doenças associadas à agregação proteica, incluindo doença de Alzheimer e Parkinson

(AYYADEVARA *et al.*, 2014). Para evitar tais doenças, as células investem em uma rede complexa de chaperonas moleculares, que usam mecanismos engenhosos para evitar a agregação e promover um enovelamento proteico eficiente. Então, a expressão e atividade das proteínas de choque térmico (heat shock proteins-HSPs) são consideradas determinantes críticos para a homeostase, bem como saúde e longevidade (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011). Proteínas nativas estão continuamente expostas a vários estresses e podem ser desnaturadas pelo desdobramento. As HSPs, família de proteínas altamente conservadas ubiquitivamente expressa na maior parte das células, são hábeis para reparar a estrutura anormal das proteínas e torná-las funcionais. Se o estresse for muito severo de forma que as HSPs não sejam capazes de realizar o reparo, então as proteínas anormais são submetidas ao sistema ubiquitina-proteassoma, levando à degradação dependente do proteassoma. Alternativamente, proteínas mal enoveladas podem formar agregados que são digeridos pela formação e fusão de agressomos e lisossomos (MURAKAMI, 2013; HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011).

Interessantemente, vários estudos têm revelado que os fitoquímicos, incluindo curcumina, resveratrol, quercetina e isoticianatos, são notáveis reguladores dos sistemas de controle de qualidade das proteínas, sugerindo que suas funções fisiológicas e biológicas são exercidas, no mínimo em parte, através da ativação dos mecanismos citados anteriormente (MURAKAMI, 2013; CALABRESE *et al.*, 2008). Curcumina além de ser um potente indutor da autofagia também induz a degradação proteasomal de muitas proteínas oncogênicas e angiogênicas. Resveratrol aumenta a expressão de HSP70 dependendo do sistema experimental empregado (tipo de célula ou tipo de estresse). Quercetina induz o processo autofágico e reduziu a meia vida das proteínas oncogênicas. E os isoticianatos também induzem a autofagia (MURAKAMI, 2013).

A família de proteínas de 70 kDa é uma das mais extensivamente estudadas. Incluídas nesta família estão HSC70 (heat shock cognate, a forma constitutiva), HSP70 (a forma induzida, também chamada de HSP72) (CALABRESE *et al.*, 2008). A expressão de HSP70 tem sido associada com a patogênese de doenças relacionadas com o mal enovelamento proteico. Aumento nos níveis de HSP70 leva, respectivamente, à redução da agregação e toxicidade de tau e A $\beta$  – dois componentes associados com a DA (CALABRESE *et al.*, 2012). Compostos provenientes da dieta podem ter um potencial para regular as HSPs, embora evidências *in vivo* ainda sejam limitadas.

Camundongos que receberam uma dieta enriquecida com uma mistura de antioxidantes ( $\beta$ -caroteno, vitaminas C e E, selênio e zinco) e foram submetidos ao estresse térmico (1 h a 42°C) tiveram um aumento da expressão de HSP 70 no fígado e no cérebro, mas não no baço (de ROOS; DUTHIE, 2014).

O retículo endoplasmático (RE) tem um papel importante na proteostase, já que é a principal organela intracelular responsável pela biossíntese de proteínas e lipídeos, enovelamento e tráfego de proteínas, homeostase do cálcio, e vários outros processos vitais na fisiologia celular (FU; GAO, 2014). Perturbação na função do RE resulta em estresse e subsequente ativação da resposta a proteínas desenoveladas (do inglês protein response-UPR). A via UPR é uma resposta celular ao acúmulo de proteínas desenoveladas no lúmen do RE, induzida por uma variedade de estímulos externos e internos, incluindo acúmulo de proteínas mal formadas. A UPR ativa chaperonas do RE, reduz a tradução de proteínas, e promove a remoção das proteínas mal enoveladas citotóxicas para restaurar a homeostase do RE. Se este processo vital falha, a célula pode ser sinalizada a entrar em apoptose, resultando em morte celular. Mantido estresse no RE pode também desencadear uma resposta inflamatória e exacerbar o estresse oxidativo, ambos os quais contribuem sinergicamente para o dano tecidual (ZHANG *et al.*, 2014; FU; GAO, 2014).

A proteína regulada pela glicose-78 (GRP78), também conhecida como BiP (Binding immunoglobulin protein), é no RE homóloga à HSP70, desempenha um papel duplo no RE, controlando o dobramento de proteínas, a fim de evitar a agregação, e através da regulação da UPR. Muitas desordens neurodegenerativas, incluindo DA, doença de Parkinson e degeneração retinal progressiva são caracterizadas pela ativação das UPR e expressão modificada da GRP78 (GORBATYUK; GORBATYUK, 2013).

É importante destacar também que, além do RE ser importante na homeostase proteica, um acúmulo de evidências sugere que o RE é crucial para o metabolismo de lipídeos. Por exemplo, camundongos que foram alimentados com dieta rica em gordura aumentaram o estresse no RE no fígado e tecido adiposo, indicando que o RE pode ser uma organela chave na mediação de mudanças metabólicas induzidas por esta dieta.

## 1.5 Propriedades Biológicas da *B. trimera*

*Baccharis trimera* (*B. trimera*), conhecida como Carqueja, pertence à família das Asteraceae. É uma planta nativa das regiões sul e sudeste do Brasil, sendo também encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (BONA *et al.*, 2005). As plantas desta família são muito estudadas em relação à sua composição química e atividade biológica, por apresentarem efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios, algumas das quais já foram utilizadas para o desenvolvimento de fármacos, inseticidas, e outros produtos (VERDI; BRIGHENT; PIZZOLATTI, 2005).

Muitas pesquisas já foram realizadas a fim de investigar a composição química da *B. trimera*. Os principais compostos identificados nos extratos de diferentes polaridades incluem: derivados do ácido quínico como, ácido 5-O-[E]-cafeoilquínico; ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5-dicafeoilquínico; 4,5-dicafeoilquínico e ácido tricafeoilquínico (ABOY *et al.*, 2011), além de lactonas diterpenos, sesquiterpenos, saponinas, taninos, polifenóis e flavonóides (SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 1991). Os flavonóides relatados até agora foram apigenina, 7,4'-di-O-metil-apigenina, cirsimaritina, eupatorina, genkwanina, hispidulina, isoquercetina, luteolina, nepetina, quercetina, 3-O-metilquercetina, 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona e rutina (SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005). A quercetina é um dos mais importantes flavonóides da dieta e está presente em alimentos vegetais, como maçãs, brócolis, cebola e muitas ervas comestíveis (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007).

A infusão das partes aéreas de *B. trimera* é vastamente usada na medicina popular no tratamento de doenças gastrintestinais, disfunções hepáticas, processos inflamatórios e diabetes (VERDI; BRIGHENT; PIZZOLATTI, 2005). O uso popular de *B. trimera* consiste em beber 50-200 mL/dia de uma infusão aquosa (4-5 g) da erva seca (COIMBRA, 1942). Porém, o uso indiscriminado das plantas medicinais vem da crença de que produtos naturais não causam mal à saúde, mas, assim como medicamentos sintéticos, as plantas possuem grupos de compostos farmacologicamente ativos que atuam nos organismos vivos, sendo necessário o conhecimento destes para avaliação de suas potencialidades terapêuticas e tóxicas (LOSQUI *et al.*, 2009).

Avaliações toxicológicas do extrato de *B. trimera* foram realizadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nogueira *et al.* (2011) observou o crescimento de células epiteliais de

rins de embrião humano (HEK) e células de hepatoma de rato (HTC) tratados com extrato aquoso de *B. trimera* variando a concentração de 1 a 500 µg/mL. O tratamento das células HEK com extrato aquoso nas concentrações de 100 µg/ml não mostrou nenhum efeito citotóxico, enquanto que o tratamento com 500 µg/ml do extrato aquoso inibiu 94,3% a proliferação celular. Essa mesma concentração do extrato inibiu em 56% o crescimento celular das células HTC (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Citotoxicidade também foi avaliada em queratinócitos humanos tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *B. trimera* (0.25, 2.5, 25 e 250 µg/mL). Efeito citocida foi observado somente na concentração mais elevada, indicando uma baixa citotoxicidade do óleo essencial (OLIVEIRA *et al.*, 2012). O extrato hidroalcoólico de *B. trimera* administrado a ratas grávidas numa concentração de 8,4 mg/kg, foi tóxico para os rins maternos e células do fígado, embora as alterações observadas foram reversíveis, permitindo a recuperação do tecido uma vez que a administração do extrato foi interrompida (GRANCE *et al.*, 2008).

Rodrigues *et al.* (2009) investigaram o efeito genotóxico/antigenotóxico em camundongos e o potencial mutagênico do extrato aquoso de *B. trimera* usando os ensaios de DNA cometa. O tratamento com extrato aquoso de *B. trimera* não causou nenhum efeito genotóxico no DNA obtido do sangue e fígado e protegeu as células contra o dano oxidativo ao DNA induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, o extrato aumentou a frequência de micronúcleos na medula óssea dos camundongos tratados, indicando uma atividade mutagênica cromossomal (PAUL *et al.*, 2009). Nogueira *et al.* (2011) tratou camundongos com 4,2 e 42 mg/Kg de extrato aquoso de *B. trimera* durante 15 dias e nenhum efeito genotóxico foi observado nas células do fígado mas induziu danos ao DNA das células do rim tratadas com ambas concentrações.

Estudos utilizando diferentes tipos de extratos de *B. trimera* também mostraram que estes possuem efeitos biológicos diversos tais antinfamatório e antiulcerativo. O extrato aquoso e fenólico de *B. trimera* foi capaz de atenuar o processo inflamatório no modelo experimental de pleurisia induzida por carrageena em ratos (OLIVEIRA *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2011; PAUL *et al.*, 2009). O pré-tratamento de ratos e camundongos com 5% de extrato aquoso de *B. trimera* reduziu úlcera gástrica induzida por etanol (GAMBERINI *et al.*, 1991). O pré-tratamento de ratos com 1,0 e 2,0 g/kg de extrato aquoso de *B. trimera* protegeu contra úlceras gástricas induzidas por estresse

induzido pelo frio, reduzindo o índice de lesão da mucosa em 26 e 41%, respectivamente, e o número de úlceras para 46 e 52% dos valores dos grupos controles respectivos (BIONDO *et al.*, 2011). Ratos tratados com 200 e 400 mg/kg de extrato bruto liofilizado (extrato hidroalcoólico 70%) de *B. trimera* tiveram uma redução de aproximadamente 90 % da área total de lesão ulcerativa em comparação ao grupo controle (DIAS *et al.*, 2009). Também foi demonstrado que *B. trimera* possui propriedades antiproteolítica e antihemorrágica em camundongos injetados com veneno de cobra (JANUÁRIO *et al.*, 2004). Já o extrato de clorofórmio de *B. trimera* apresentou efeito relaxante da musculatura lisa em ratos (TORRES *et al.*, 2000). Além disso, a fração aquosa de *B. trimera* reduziu significativamente a glicemia no modelo experimental de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Mais recentemente, Pádua *et al.* (2013) mostraram uma ação hepatoprotetora, confirmada por análises histopatológicas, do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* em um modelo de rato cujo dano hepático foi induzido pelo acetaminophen (APAP).

Além das propriedades citadas acima, o potencial antioxidante de diferentes extratos de *B. trimera* foram avaliados *in vitro* e *in vivo*. Os extratos aquosos, alcoólicos, hidroalcoólico e fenólicos de *B. trimera* foram ativos contra o radical DPPH·(1,1-difenil-2-picril-hidrazil) (OLIVEIRA *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2009; CZYEWski *et al.*, 2008; SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005). O extrato aquoso também mostrou atividade antioxidante *in vitro* pelo ensaio da xantina oxidase (RODRIGUES *et al.*, 2009). Extratos aquoso e etanólico de *B. trimera* inibiram a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil e peroxinitrito em microssomas de fígado de rato e lipossomas de soja. Os extratos foram também considerados potentes eliminadores de radicais hidroxilas, formados a partir das reações de Haber-Weiss e de Fenton (VIEIRA *et al.*, 2011). Pádua *et al.* (2010) observaram efeitos antioxidantes *in vitro*. O tratamento de neutrófilos de ratos Fisher com extrato hidroalcoólico de *B. trimera* na concentração de 5 µg/mL inibiu a liberação de ERO em 85% e manteve a viabilidade celular de 93%. Em relação aos efeitos antioxidantes *in vivo*, Pádua *et al.* (2010) observaram o efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* na modulação de ERO em neutrófilos de ratos tratados com acetaminofren (APAP). Animais pré-tratados com *B. trimera* ou quercetina e depois expostos ao APAP tiveram uma redução significativa na produção

de ERO quando comparados com neutrófilos de ratos que receberam somente o APAP. Nos animais tratados somente com *B. trimera* não se observou redução na produção de ERO. Entretanto, animais tratados somente com quercetina mostraram uma redução significativa na produção de ERO (PÁDUA *et al.*, 2010). Pádua *et al.* (2013) observaram que *B. trimera* foi capaz de reduzir o estresse oxidativo causado por dano hepático induzido pelo APAP em rato. O pré-tratamento com o extrato diminuiu a atividade da enzima SOD e aumentou a atividade da CAT e a concentração de glutathiona total.

Esta propriedade antioxidante pode ser atribuída aos compostos presentes na *B. trimera*. Vários estudos já foram publicados mostrando as propriedades antioxidantes utilizando a quercetina e os derivados cafeoil isoladamente. Moretti *et al.* (2012) mostrou um efeito antioxidante significativo do tratamento com quercetina e rutina na lipoperoxidação lipídica induzida por *t*-BOOH em esperma humano (MORETTI *et al.*, 2012). Outro estudo avaliou os efeitos protetores da quercetina contra o estresse oxidativo causado pela intoxicação com fluorido de sódio (NaF) em homogenato de coração de rato. Foi observada uma redução nos níveis do ácido tiobarbitúrico (TBARS), aumento da atividade das enzimas SOD e CAT e um aumento nos níveis de GSH no grupo que recebeu o pré-tratamento com quercetina, restabelecendo aos valores semelhantes ao do grupo normal (grupo que recebeu solução salina e não foi intoxicado com NaF) (NABAVI *et al.*, 2012). Barcelos *et al.* (2011) tratou ratos com metilmercúrio (MeHg) e quercetina com doses que refletem a exposição humana. Os animais receberam MeHg, quercetina ou combinação dos dois por 45 dias. MeHg diminuiu a concentração de GSH e a atividade da GPx em 17 e 12% respectivamente. Quando a quercetina foi fornecida em combinação com MeHg, os níveis de GSH e GPx aumentaram, restaurando a valores normais (BARCELOS *et al.*, 2011). Em culturas de células neuronais tratadas com quercetina foi observada ativação da translocação nuclear de Nrf2 e um aumento da resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparado a células não tratadas (ARREDONDO *et al.*, 2010). Estudos realizados com células de leucemia mielóide aguda de humanos e com *Drosophila* mostraram que a quercetina interage com proteínas nucleares (GUTZEIT *et al.*, 2004; BÖHL *et al.*, 2005).

Os ácidos 4-O-cafeoilquínico e 3,5-O-dicafeoilquínico e seu derivado etil ester obtidos do extrato de *A. gmelinii* foram mais ativos contra o radical DPPH que o controle positivo, Trolox, e semelhante à quercetina (KÖNCZÖL *et al.*, 2012).



Derivados cafeóilicos da planta *D. asper* também exibiram atividade contra a formação do radical DPPH e inibiram significativamente a oxidação de LDL mediada por  $\text{Cu}^{2+}$  (HUNG *et al.*, 2006). Células endoteliais vasculares umbilical de humanos tratadas com o ácido 3-O-cafeoil-1-metilquínico (MCGA3) purificado do extrato etanólico da folha de bambu foram mais resistentes ao *t*-BOOH e tiveram a expressão induzida da enzima heme oxigenase-1. Além disso, os níveis da proteína Nrf2 no núcleo aumentaram em um estágio precoce do tratamento com MCGA3 em paralelo com a diminuição dos níveis de Nrf2 no citoplasma (KWEON *et al.*, 2006).

Além disso, sabe-se a quercetina e os ácidos cafeoilquínicos também têm efeitos neuroprotetores. Ho *et al.* (2013) demonstraram que o tratamento com quercetina-3-O-glucuronide reduziu a formação de peptídeos  $\beta$ -amilóide ( $\text{A}\beta$ ) em culturas de neurônios primários gerados a partir de um modelo de rato para DA Tg2576. Além do mais, quercetina-3-O-glucuronide foi capaz de interferir com a interação proteína-proteína de  $\text{A}\beta_{1-40}$  e  $\text{A}\beta_{1-42}$  que é necessária para a formação dos oligômeros neurotóxicos e melhorar os déficits no hipocampo na formação da transmissão sináptica basal e potenciação de longa duração que ocorrem na DA (HO *et al.*, 2013). O pré-tratamento de cultura de células primárias do hipocampo de ratos com baixas doses de quercetina (5 e 10  $\mu\text{M}$ ) atenuou a citotoxicidade induzida pelo  $\text{A}\beta_{1-42}$ , porém o tratamento com concentrações mais altas (20 e 40  $\mu\text{M}$ ) além de não apresentarem efeitos neuroprotetores diminuíram a viabilidade celular (ANSARI *et al.*, 2009).

Adicionalmente, os ácidos cafeoilquínicos protegeram linhas de células de neuroblastoma MC65 e SHSY5Y contra a toxicidade do peptídeo  $\beta$ -amilóide, e mostraram um efeito neuroprotetor em cérebro de camundongos. Estes ácidos também foram capazes de aumentar a aprendizagem espacial e memória em ratos com envelhecimento acelerado (SAMP8) (ROSSI, 2008; GRAY, 2014; SASAKI, 2013).

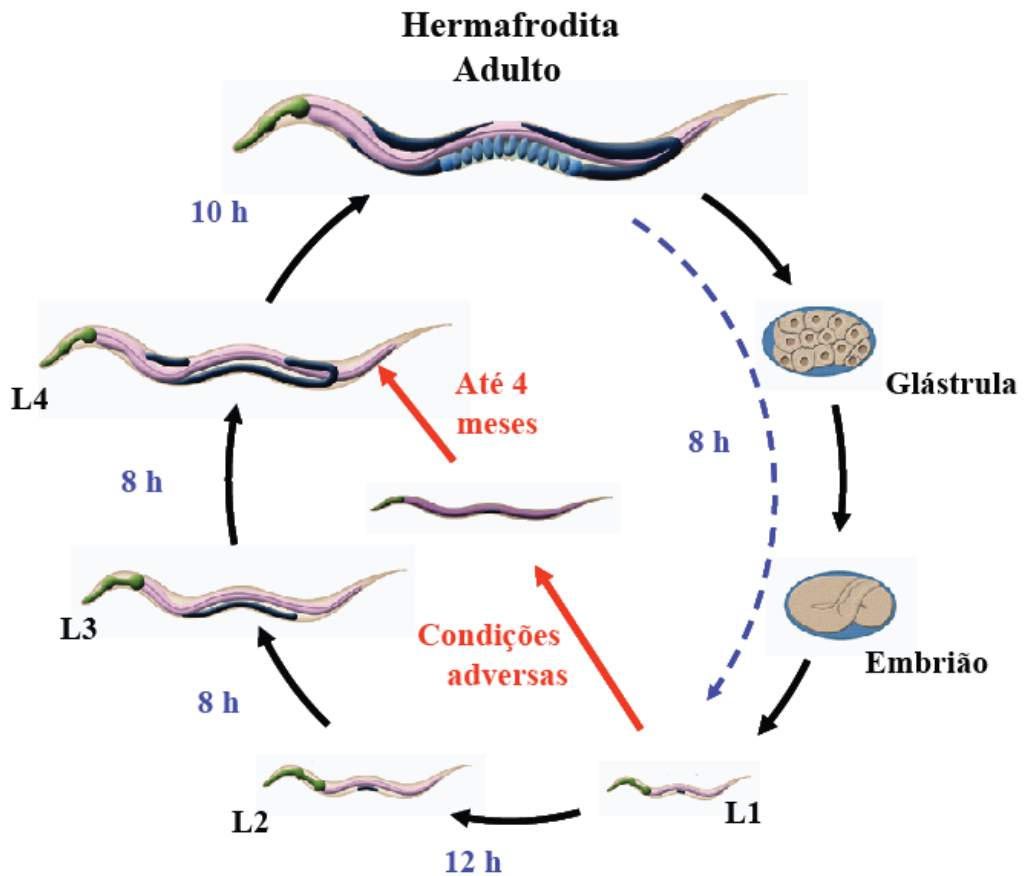
Considerando todas estas informações acima, fica clara a importância de se caracterizar melhor as propriedades antioxidantes da *B. trimera*. Ao longo das últimas décadas, foram desenvolvidas novas técnicas e metodologia para acelerar o processo de bioprospecção e caracterização de produtos naturais (YOUNES; VARELLA; SUFFREDINI, 2007). Dentro deste o estudo destas propriedades em diferentes organismos modelos tais como leveduras (COLLINSON *et al.*, 2011), *Drosophila*

(BÖHL *et al.*, 2005) e *Caenorhabditis elegans* (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007) tem sido amplamente utilizado. No presente trabalho os efeitos antioxidantes do extrato hidroalcolico de *B. trimera* foram avaliados no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

## 1.6 O *C. elegans* como um Organismo Modelo Biosensor

O *Caenorhabditis. elegans* é um nematodo terrestre de vida livre componente da família Rhabditidae que durante as últimas três décadas se tornou um organismo modelo para o estudo de comportamento, fisiologia e genética animal. Entre as várias características notáveis do *C. elegans* estão: a abundância de recursos genômicos incluindo o genoma completamente sequenciado (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1999), um banco de dados de bioinformática facilmente acessível (CHEN *et al.*, 2005), microarranjos de DNA (REINKE, 2002), um consórcio de construção de mutantes “knock-out” (<http://celeganskoconsortium.omrf.org>), e a capacidade para análise de perda de função por RNAi de maneira rápida e em larga escala (SUGIMOTO, 2004). Estes recursos, junto ao fato que cerca de 60-80% dos genes homólogos aos humanos foram identificados no *C. elegans* (KALETTA; HENGARTER, 2006), têm ajudado a compreender vários processos biológicos comuns a todos os animais, como por exemplo, o metabolismo xenobiótico e envelhecimento.

Na natureza, *C. elegans* vive na água intersticial e é capaz de uma rápida dispersão utilizando como estratégia um tempo de geração rápido e a produção de uma descendência grande (RIDDLE; ALBERT, 1997). Os *C. elegans* são encontrados predominantemente como hermafroditas (>99%) que se autofecundam e a população pode ser mantida efetivamente isogênica já que um hermafrodita individual produz uma progênie de aproximadamente 300 clones durante a primeira semana de vida adulta. O hermafrodita grávido expelle o ovo e após sua eclosão, passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta. Os hermafroditas adultos autofecundam-se, iniciando um novo ciclo de vida (Figura 2). Por ser um verme transparente, marcadores fluorescentes, por exemplo, genes repórteres, podem ser observados nos animais vivos.



**Figura 2.** Ciclo de vida do *C. elegans* a 22°C. O hermafrodita grávido expele o ovo e após sua eclosão, passa por quatro estágios larvais até chegar à fase adulta. Os hermafroditas adultos autofecundam-se, iniciando um novo ciclo de vida. Se os vermes no estágio L1 forem submetidos a condições adversas, como privação alimentar, eles podem entrar em um estado de diapausa por até 4 meses. Restabelecendo as condições favoráveis os animais retornam o desenvolvimento. Fonte: worm atlas.

No solo, os animais ingerem, além das bactérias, o líquido ao redor juntamente com as substâncias dissolvidas ou suspensas. Uma linha de defesa contra a ingestão de substâncias nocivas é comportamental: *C. elegans* pode sentir a presença de determinados produtos químicos e evitá-los (BARGMANN; MORI, 1997). O sistema celular de desintoxicação de xenobióticos é outro mecanismo fundamental para a sua sobrevivência em ambientes desfavoráveis.

Vários pesquisadores já utilizaram o *C. elegans* como um biosensor para descobrir compostos sintéticos e naturais com atividades biológicas. Entre aqueles com propriedades antioxidantes e pró-longevidade podemos citar a metformina, biguanidina usada para tratamento de diabetes tipo 2 (ONKEN; DRISCOLL, 2010), os anticonvulsantes etosuximida, trimetadiona e ácido valpróico (EVASON *et al.*, 2008; EVASON *et al.*, 2005), o antidepressivo 3,3-dietil-2-pirrolidona (PETRASCHECK *et al.*, 2007), vitamina E (WILSON *et al.*, 2006; ADACHI; ISHII, 2000), extratos de mirtilo “blueberry” ricos em polifenóis (WILSON *et al.*, 2006), extrato de *Ginkgo biloba*, complexo rico glicosídeos e terpenóides (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007), a quercetina, flavonóide abundante em plantas comestíveis (PIETSCH *et al.*, 2009), o resveratrol, polifenol abundante nas cascas de uva (BASS *et al.*, 2007) e os isotiocianatos, sulforafano e alil isotiocianato (HASEGAWA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O *C. elegans* apresenta grandes vantagens em relação à cultura de célula, pois ele é um organismo multicelular que permite que a ação dos compostos seja avaliada de uma forma sistêmica. Além disso, o cultivo e os experimentos realizados com este organismo são muito mais baratos comparados com camundongos ou outro modelo mamífero. Isto se deve principalmente porque no caso do *C. elegans*, o requerimento de animais não é limitante, pois eles crescem rapidamente em um sistema simples e barato onde podem ser gerados milhares de animais em alguns poucos dias já que ele possui um ciclo de vida curto – dois dias – e o tempo de vida dos animais tipo selvagem é de aproximadamente três semanas. Estas vantagens permitiram o desenvolvimento de estratégias de alta demanda para identificação de compostos que alteram a longevidade do *C. elegans* (FITZGERALD *et al.*, 2009).

## 1.7 Regulação da Resposta de Detoxificação e Resistência ao Estresse no *C. elegans*

No *C. elegans*, o metabolismo xenobiótico e ativação de enzimas de detoxificação são controlados, em parte por SKN-1, um ortólogo das proteínas Nrf, e por DAF-16, ortólogo das proteínas FoxO.

DAF-16 é controlado pela atividade de DAF-2, homólogo ao receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em mamíferos, que reprime DAF-16 através da fosforilação e retenção no citoplasma. Na ausência da via de sinalização do receptor de insulina/DAF-2, DAF-16/FoxO se transloca para o núcleo e regula a expressão de genes envolvidos na promoção da resistência ao estresse, metabolismo de gordura, proteção contra patógenos, regulação da formação da diapausa e longevidade (MURPHY, *et al.* 2006). Oh *et al.* (2005) mostram que a via de sinalização JNK-1 age em paralelo com a via da insulina/DAF-2 para regular a longevidade do *C.elegans*. JNK-1 interage diretamente, fosforila e regula positivamente DAF-16. Em resposta ao estresse térmico, JNK-1 promove a translocação nuclear de DAF-16 (OH *et al.*, 2005).

O SKN-1 é uma proteína bZIP que se liga a sequência WWTRTCAT (BLACKWELL *et al.*, 1994) atuando de forma análoga ao fator Nrf de mamíferos promovendo resistência ao estresse e longevidade (AN; BLACKWELL, 2003; WALKER *et al.*, 2000). Em condições normais, SKN-1 é expresso constitutivamente nos dois neurônios ASI que detectam ou regulam a ingestão alimentar (YOU *et al.*, 2008). Nestes neurônios, SKN-1 é necessário para o aumento da longevidade provocada pela restrição calórica (BISHOP; GUARENTE, 2007).

SKN-1 também é expresso nas células intestinais, porém de maneira controlada. Em condições normais, SKN-1 é negativamente regulado através da fosforilação pela enzima glicogênio sintetase quinase (GSK-3) prevenindo sua acumulação no núcleo (AN *et al.*, 2005). Foi também demonstrado que a via da IIS (via de sinalização da insulina) regula diretamente o fator de transcrição SKN-1. DAF-2 ativa as enzimas fosfatidilinositol 3-quinase AGE-1 (PI3K), PDK-1, e AKT-1/2 quinases que antagonizam o fator de transcrição SKN-1 (TULLET *et al.*, 2008), assim como DAF-16, o fator ortólogo de FoxO. Assim como nos mutantes *daf-2*, mutações em SKN-1 dirigidas para os sítios de fosforilação da AKT resultam na localização nuclear

constitutiva de SKN-1. A deleção de *skn-1* em mutantes *daf-2* suprime os fenótipos da resistência ao estresse oxidativo e a longevidade, associados a este último (TULLET *et al.*, 2008). Além disso, o envelhecimento é retardado nos animais quando SKN-1 é superexpresso transgenicamente, e quando possuem o sítio de fosforilação para AKT-1/2 mutados na ausência de *daf-16* (TULLET *et al.*, 2008). Estes dados mostram que a via de IIS inibe diretamente SKN-1 em paralelo a DAF-16 e que SKN-1 contribui para a resistência ao estresse e longevidade, que são observados quando ocorre a redução da atividade de IIS.

Choe *et al.* (2009) sugerem que SKN-1 entra no núcleo constitutivamente mas que em condições normais ela se associa com a proteína WDR-23 e o complexo protéico da ubiquitina ligase CUL-4/DDB-1 sugerindo que SKN-1 deva ser degradado pelo sistema proteossômico. Também foi demonstrado que WDR-23 regula negativamente a expressão de genes de detoxificação de fase 2 (HASEGAWA; MIWA, 2010).

Já em condições de estresse oxidativo induzido por paraquat ou calor, SKN-1 acumula no núcleo das células do intestino e ativa a transcrição dos genes *gcs-1* (AN; BLACKWELL, 2003) e *gst-4* (HASEGAWA *et al.*, 2010). A localização nuclear de SKN-1 requer a sua fosforilação pela PMK-1, uma quinase conservada pertencente da via de sinalização da p38 MAPK. SEK-1, a MAPK quinase que fosforila PMK-1 é necessária para ativar a translocação de SKN-1 no núcleo e ativar a expressão de *gcs-1* (INOUE *et al.*, 2005). Os mutantes com perda de função *skn-1* e *sek-1* são mais sensíveis ao estresse oxidativo e possuem um tempo de vida reduzido em cerca de 25-30%, o que é consistente com associações feitas entre estresse oxidativo e longevidade (INOUE *et al.*, 2005; AN; BLACKWELL, 2003).

Recentemente, foi demonstrado que a via de sinalização ERK MAPK também regula a atividade de SKN-1 e DAF-16 (OKUYAMA *et al.*, 2010). A inibição da expressão dos genes da via ERK diminui a longevidade de animais tipo selvagem, mas não de mutantes *daf-16* e *skn-1* sugerindo que a longevidade controlada pela via ERK MAPK depende de SKN-1 e DAF-16 (OKUYAMA *et al.*, 2010).

Assim como as proteínas Nrf2, SKN-1 também é ativado por diversos antioxidantes indiretos. *C. elegans* tratados com curcumina foram mais resistentes ao

estresse oxidativo induzido pelo juglone e tiveram uma indução da expressão dos genes de resposta ao estresse *gst-4* e *hsp-16.2* em um mecanismo dependente de SKN-1 (YU; WEI, LIAO, 2014). O trissulfido dialil constituinte do alho (DATS) aumentou a longevidade do *C. elegans* e a induziu a expressão de *gst-4* de maneira dependente de SKN-1 (POWOLNY *et al.*, 2011). O tratamento de *C. elegans* com alil isotiocianato (AITC) induziu a expressão de *gst-4p::GFP*, mediada por SKN-1, e aumentou a resistência ao estresse oxidativo causado pelo herbicida paraquat (HASEGAWA *et al.*, 2010). Além disso, o tratamento de *C. elegans* com sulforafano ativou localização nuclear de SKN-1 e a expressão de *gcs-1p::GFP* e *gst-4p::GFP* no intestino. Quando o tratamento foi de curta duração, o sulforafano também aumentou a longevidade do *C. elegans* de maneira significativa e dependente de *skn-1*, *sek-1* e *daf-16* (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Entretanto, quando o tratamento foi feito por longa duração ou em altas concentrações de AITC ou sulforafano, a longevidade do *C. elegans* foi reduzida de maneira significativa (HASEGAWA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O tratamento de *C. elegans* com extrato aquoso de açaí aumentou a resistência ao estresse induzido por t-BOOH de maneira dependente de DAF-16 (BONOMO *et al.*, 2014). O ácido quínico protegeu o *C. elegans* e aumentou a sobrevivência dos vermes sob condições de estresse térmico e oxidativo (17.8% e 29.7%, respectivamente). O ácido quínico ainda aumentou a expressão de *hsp-16.2* sob condições de estresse térmico e, sob condições normais, ativou a expressão de *daf-16* e *sod-3* dependente de DAF-16 (Zhang *et al.*, 2012). *C. elegans* tratados com quercetina foram mais resistentes ao estresse oxidativo e tiveram um aumento de 15% na longevidade. A quercetina também ativou a translocação nuclear de DAF-16, frequentemente relacionado com resposta ao estresse e longevidade (KAMPKÖTTER *et al.*, 2008).

## **1.8 *C. elegans* como Modelo para Estudo da Doença de Alzheimer**

Organismos modelos que simulam respostas em humanos oferecem enormes oportunidades para testar o papel potencial dos produtos naturais nas doenças neurodegenerativas. Linhagens transgênicas de *C. elegans* que expressam o peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) de humanos têm sido usadas para o estudo dos mecanismos moleculares

da toxicidade do peptídeo A $\beta$  e também para triagem de compostos terapêuticos que visam melhorar a toxicidade causada pelo A $\beta$  (SANGHA *et al.*, 2012).

Muitos transgênicos têm sido criados em que uma sequência sinal seguido por uma sequência A $\beta$  de humanos é expressa em todas as células, em todos os neurônios, em conjuntos específicos de neurônios ou em células musculares. Estas linhagens produzem tanto A $\beta$ 1-42 ou A $\beta$ 3-42 (ALEXANDER; MARFIL; LI, 2014).

A DA é uma doença neurodegenerativa de início tardio. *C. elegans* expressando o A $\beta$ 3-42 humano nos músculos mostraram uma paralisia dependente da idade a 20°C. A paralisia ocorreu mais rapidamente e mais severamente quando A $\beta$ 1-42 foi produzido a 25°C. Sabendo que o A $\beta$  é tóxico para os neurônios e causa paralisia muscular no *C. elegans*, moléculas e vias que previnem a formação ou promovem a quebra dos agregados A $\beta$  podem ser investigados em *C. elegans* (ALEXANDER; MARFIL; LI, 2014). Kumar (2015) tratou o *C. elegans* com silymarina, uma flavona da semente de *Silybum marianum*, e observou um aumento no tempo de vida médio dos animais. Além disso, animais idosos tratados com silymarina mostraram melhor taxa de locomoção, maiores respostas a estímulos e tolerância ao estresse. Silymarina retardou a paralisia nos transgênicos CL4176, que expressa o A $\beta$  nas células musculares de maneira induzida, através do aumento da resistência ao estresse oxidativo (KUMAR, 2015). O tratamento com Liuwei Dihuang (LWDH), utilizado na medicina chinesa, retardou a paralisia do *C. elegans* transgênico CL4176. Entretanto, não foi observada redução no depósito de  $\beta$ -amilóide na linhagem CL2006, que expressa constitutivamente o A $\beta$ 1-42 de humanos. LDWH reduziu a produção de ERO na linhagem CL4176, o que correlaciona com o aumento da resistência ao estresse oxidativo causado por juglone em animais tipo selvagem, e aumentou a expressão de *hsp-16.2* nos animais transgênicos CL4176 (SANGHA *et al.*, 2012). Wu *et al.* (2006) utilizaram a linhagem CL416 para observar o efeito do tratamento com Ginkgo biloba (EGb 761) na paralisia induzida nestes animais. Foi observado um retardo na paralisia nos animais alimentados com o extrato em relação ao controle. O EGb 761 também inibiu a oligomerização e depósito de A $\beta$  na linhagem CL2006. Além do mais, a redução do estresse oxidativo não foi o mecanismo pelo qual o EGb 761 reprimiu a paralisia induzida pelo A $\beta$ , mas sim pela modulação das espécies oligoméricas A $\beta$  (WU *et al.*, 2006).



Vários ortólogos das proteínas chaperonas de choque térmico de humanos foram encontradas interagir diretamente com A $\beta$ 3-42 em *C. elegans*. Proteínas HSP-16 ligam-se aos monômeros e oligômeros solúveis de A $\beta$ 3-42. Além disso, os níveis do transcrito HSP-16 foi maior na linhagem transgênica A $\beta$ 3-42. Porém se essas chaperonas protegem contra ou promovem a paralisia do A $\beta$  não é claro (FONTE *et al.*, 2002).

Neste trabalho, nós utilizamos o *Caenorhabditis elegans* como modelo para investigar os efeitos antioxidantes do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse e longevidade, assim como seus possíveis mecanismos subjacentes, e para investigar se o EHB tem um efeito protetor em um modelo de *C.elegans* para doença de Alzheimer.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Utilizar o *Caenorhabditis elegans* como modelo para investigar o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse e longevidade, assim como seus possíveis mecanismos subjacentes, e para investigar se o EHB tem um efeito protetor em um modelo de *C.elegans* para doença de Alzheimer.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antioxidante do EHB *in vitro* através da determinação de polifenóis totais e de ensaios de inibição do radical DPPH.
- Avaliar potencial antioxidante do EHB *in vivo* através da análise de ensaios de sobrevivência do *C. elegans* sob condições normais e de estresse oxidativo.
- Avaliar se o EHB tem algum efeito no crescimento bacteriano, tamanho corporal, reprodução ou ingestão alimentar dos animais.
- Investigar os possíveis mecanismos envolvidos no potencial antioxidante promovido pelo EHB através da análise da expressão das enzimas de detoxificação e do envolvimento dos fatores de transcrição SKN-1 e DAF-16 e das vias de sinalização p38, JNK e ERK MAPK.
- Avaliar o efeito do EHB na paralisia induzida no modelo para DA, na homeostase protéica e na expressão de chaperonas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Cepas e Linhagens

As cepas utilizadas neste projeto foram obtidas através do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), University of Minnesota, EUA (<http://www.cbs.umn.edu/CGC>) ou do Dr. T. Keith Blackwell do Joslin Diabetes Center, Boston, EUA. Foi utilizada a cepa tipo selvagem N2 Bristol, as cepas mutantes de deleção “knockout” BA17, *fem-1(hc17)*; EU1, *skn-1(zu67)IV/nT1*; CF1038, *daf-16(mu86)*; AU3, *nsy-1(ag3)*; KU4, *sek-1(km4)*; VC8, *jnk-1(gk7)*; AM1, *osr-1(rm1)*; KU25, *pmk-1(km25)*; MH37, *mpk-1(ku1)/unc-32(e189)*; MT2605, *unc-43(n498n1186)*; e as cepas transgênicas LD1171, *Is003 (gcs-1::GFP)*; CL2166, *dvls19[pAF15(gst-4::GFP::NLS)]*; CL2070, *dvIs70[pCL25(hsp-16.2p::GFP)+pRF14(rol-6)]*; SJ4005, *zcls4[hsp-4::GFP]*; e CL4176, *(smg-1(cc546) dvls[pAF29(myo-3/Ab<sub>1-42</sub>/let UTR)+pRF4[rol-6(su10069)]*).

#### 3.2 Crescimento e Manutenção do *C. elegans*

As cepas foram mantidas congeladas até o momento de uso. O congelamento foi feito transferindo animais L1 para uma solução 1:1 de M9 (22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 85,5 mM NaCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>) e solução de congelamento (50 mM Tampão Fosfato; 100 mM NaCl; 30% de glicerina). Alíquotas desta mistura foram coladas em tubos de 1,5 mL e colocadas no freezer -80°C. Quando necessário, as cepas utilizadas foram descongeladas e transferidas para o meio NGM (Nematode Growth Medium) (BRENNER, 1974) semeadas com *E. coli* OP50 como alimento e incubada a 20°C, o que permitiu o desenvolvimento normal do ciclo de vida, exceto para a linhagem CL4176, mantida a 16°C. A manutenção das cepas foi feita transferindo animais em diferentes estágios para novas placas à medida que a camada de bactéria ficava escassa.

#### 3.3 Sincronização Cronológica do *C. elegans*

Para todos os experimentos os animais tiveram sua idade sincronizada. A sincronização para a maioria das cepas foi feita através da lise alcalina. A lise alcalina

baseia-se no tratamento de hermafroditas adultos grávidos com solução de lise (50% de hipoclorito de sódio; 2,5 mM NaOH). Os embriões resistentes a este tratamento foram coletados e colocados em meio líquido M9 de um dia para o outro na ausência de alimento. Isto permite que os embriões eclodam, mas permaneçam estacionários em L1. Os animais L1 foram então transferidos para placas NGM semeadas com *E. coli* OP50 por 48h a 20°C, tempo necessário para o *C. elegans* chegar a L4. Somente para o mutante *skn-1(zu67)* e os transgênicos *Is003 (gcs-1::GFP)* e CL4176, (*smg-1(cc546) dvls[pAF29(myo-3/Aβ<sub>1-42</sub>/let UTR)+pRF4[rol-6(su10069)]*) a sincronização foi feita por ovoposição. Neste caso, cerca de 50 a 100 transgênicos grávidos foram transferidos para placas com ou sem tratamento durante 4 horas, tempo suficiente para que cada animal colocasse certa quantidade de embriões no mesmo estágio de desenvolvimento. Após esse período os vermes adultos eram retirados das placas.

### **3.4 Extrato de *B. trimera***

#### **3.4.1 Coleta do Material Botânico**

As partes aéreas de *B. trimera* foram coletadas em agosto e outubro de 2012, na cidade de Mariana, Minas Gerais, Brasil. A espécie foi identificada pela Técnica Doutora Viviane R. Scalon e em seguida depositada no Herbário José Badini da UFOP.

#### **3.4.2 Preparo do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB)**

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

### 3.5 Caracterização do Extrato *in vitro*

#### 3.5.1 Dosagem de Polifenóis Totais

O conteúdo de polifenóis totais do EHB foi determinado pelo método do Folin-Ciocalteu como descrito por GEORGÉ et al (GEORGÉ *et al*, 2005). Em síntese, 2,5 mL do reagente Folin diluído em água destilada (1:10) foi adicionado a 500 µL da amostra ou solução padrão de ácido gálico. O branco foi água destilada. Depois de 2 minutos à temperatura ambiente, 2 mL da solução de carbonato de sódio 7.5% foi adicionado e misturado vigorosamente e incubado a 50°C por 15 minutos e, as misturas, colocadas num banho de gelo. Absorbância relativa ao branco foi determinada a 760 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mililitro de extrato.

#### 3.5.2 Atividade Sequestradora de Radicais Livres

A metodologia utilizada para determinar a capacidade do EHB em neutralizar o radical DPPH foi adaptada de Brand-Williams *et al* (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Três concentrações de EHB (0,5; 5; e 50 mg/ml) foram utilizadas. Basicamente, 100 µL dos extratos nas diferentes condições e o antioxidante padrão Trolox foram adicionados a 3,9 mL de DPPH 60 µM dissolvido em metanol 80%. A mistura foi homogeneizada e mantida no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância da solução foi determinada a 515 nm e metanol 80% foi usado como branco. A atividade antioxidante foi determinada pela redução da absorbância do radical DPPH a 515 nm; a percentagem de inibição foi determinada de acordo com a fórmula abaixo. Estes experimentos foram repetidos com o extrato na presença de *E. coli* OP50 e *E. coli* OP50 morta pelo antibiótico kanamicina.

$$\% \text{ inibição} = (1 - A_{\text{amostra } 515} / A_{\text{controle } 515}) \times 100$$

### 3.6 Preparo das Placas NGM Contendo EHB

O EHB foi diluído em solução basal (0.1 M NaCl, 50 mM tampão KPO<sub>4</sub>) obtendo-se as concentrações de 0.5, 5 e 50 mg/mL. A *E. coli* OP50 cresceu em meio LB líquido até densidade ótica (OD) igual a 1.0 e, logo após, foi centrifugado para se obter um pellet da bactéria. Este foi ressuscitado com as diferentes concentrações do EHB diluído em solução basal acrescido de 10 mM MgSO<sub>4</sub> e semeado nas placas contendo NGM. Como controle foi utilizada o pellet da bactéria OP50 ressuscitado em quantidade proporcional de solução basal e MgSO<sub>4</sub> e semeada em placa com NGM.

Para o preparo da *E. coli* OP50 morta pelo antibiótico Kanamicina (Kan) foram realizadas as mesmas etapas do preparo das placas contendo *E. coli* OP50. Depois que as placas foram semeadas com o pellet ressuscitado com o EHB, estas foram colocadas em estufa 37°C overnight. No dia seguinte, o antibiótico kan (10 mM) foi adicionado em cima do alimento. As placas foram mantidas na estufa durante 5 dias, tempo suficiente para que a bactéria morresse. Diariamente foi feito o estriamento da *E.coli* OP50 + kan para confirmar a sua morte.

#### 3.6.1 Preparo das Placas NGM Contendo EHB para os Experimentos de RNAi

Neste trabalho, nós utilizamos a técnica de RNA de interferência (RNAi) por alimentação para reduzir os níveis de expressão de *skn-1* e *daf-16*. Esta metodologia consiste na clonagem, em bactérias *E. coli* HT115, de um plasmídeo pL4440, contendo um fragmento exônico do gene alvo, sintetizando assim o dsRNA pela indução com IPTG. Os clones de RNAi foram crescidos em placas com 12.5 µg/mL de tetraciclina e 100 µg/mL de ampicilina. As bactérias foram crescidas por aproximadamente 6 h, até atingirem OD1, em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) (caseína 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L) pH 7.0 acrescido de 60 µg/mL de ampicilina. Em seguida, os inóculos foram centrifugados por 30 minutos a 4°C a 4000 RPM. Após a centrifugação, o *pellet* de bactérias foi ressuscitado com 50 mg/mL de EHB ou solução controle. Estes inóculos foram semeados em placas de NGM Plus (NaCl 3g/L; Bactopectona 2,5g/L; Extrato de levedura 0,8 g/L; Agar bacteriológico 17g/L; Colesterol 1mg; CaCl 1M; MgSO<sub>4</sub> 1M; KPO<sub>4</sub> 25M) contendo 1mM de IPTG e

mantidas a temperatura ambiente para secarem formando uma camada de bactérias que serviu de alimento para o *C. elegans*.

Os animais tipo selvagem, sincronizados em L1, foram crescidos em placas contendo uma camada de HT115 contendo o plasmídeo pL4440 com a sequência exônica de *skn-1* ou *daf-16* ou em grupo controle (HT115 contendo apenas o plasmídeo pL4440). A confirmação da eficiência do RNA para *skn-1* foi feita ao verificar a ausência de larvas nas placas *skn-1(RNAi)*. Para a confirmação da eficiência do RNAi para *daf-16*, animais transgênicos que expressam *daf-16* fundidos a uma proteína verde fluorescente foram crescidos em placas *daf-16(RNAi)* e tiveram sua fluorescência analisada, com a diminuição da fluorescência indicando o sucesso do RNAi.

### **3.7 Ensaio de Crescimento Bacteriano**

Para acompanhar o crescimento da *E. coli* OP50 realizamos leituras de densidade ótica (OD) em espectrofotômetro. A bactéria *E. coli* OP50 ( $OD_{595}=0,05$ ) foi ressuspendida com LB e diferentes concentrações do EHB (0,5; 5; e 50 mg/ml) e a  $OD_{595}$  neste ponto foi considerada o ponto zero. Os tubos foram incubados no shaker à 37°C e a  $OD_{595}$  foi mensurada a cada 40 minutos até exceder  $OD=1$ . Os resultados foram expressos como níveis relativos. A OD da *E. coli* OP50 foi comparada em cada ponto com a OD no ponto zero de cada condição. Três experimentos individuais foram realizados.

### **3.8 Tamanho Corporal e Progênie**

Para medir o tamanho corporal, 20 animais tipo selvagem foram tratados ou não com 50 mg/mL EHB desde L1 até L4 e foram fotografados utilizando o microscópio Zeiss Axio Imager Z2 (NY, USA). O tamanho corporal foi medido ao longo do animal e determinado pelo software AxioVision Rel. 4.8.

Para quantificar a progênie, animais tipo selvagem foram tratados ou não com 50 mg/mL EHB desde L1 até L4. Então 10 animais L4 foram individualmente transferidos, diariamente, para novas placas de NGM contendo ou não 50 mg/mL EHB, até o fim do

período reprodutivo. O número total da progênie de cada placa foi contada diariamente e dividida pelo número de animais. Três experimentos individuais foram realizados para cada experimento.

### **3.9 Batimento Faríngeo**

A taxa de batimento faríngeo foi quantificada usando animais tipo selvagem L4 tratados ou não com 50 mg/mL EHB desde L1. Para cada condição, 10 animais foram colocados individualmente em lâminas contendo uma fina camada de ágar e *E. coli* OP50 por 5 min. O batimento faríngeo foi gravado durante 2 min usando o microscópio Olympus CX21 (PA, USA) conectado a uma câmera (VideolabsAmScope FMA050, MN, USA). A filmagem foi digitalizada e regravada no modo lento usando o software Windows Movie Maker (Microsoft Corp., 2002). O número de batimentos foi determinado como uma média de três contagens independentes de 20 segundos de cada animal. O batimento foi definido como cada movimento de bombeamento da faringe. Este experimento foi realizado duas vezes.

### **3.10 Ensaio de Longevidade**

A cepa mutante *fem-1(hc17)* foi utilizada nos ensaios de longevidade. Animais mutantes *fem-1* não são capazes de colocar ovos férteis a 25°C porque nessa temperatura de cultivo todos os animais são fêmeas. Porém, a 20°C estes animais se comportam como animais selvagens e geram ovos férteis. Animais mutantes *fem-1* foram sincronizados por lise alcalina e os L1 foram transferidos para 25°C. Os animais foram mantidos por todo tempo de vida em placas contendo ou não B. trimera (0.5, 5, 50 mg/mL). Aproximadamente 90 animais foram divididos em 3 placas com 30 animais cada. A sobrevivência dos vermes foi verificada diariamente. Os dados foram analisados no programa estatístico GraphPad Prism versão 5 para construção dos gráficos de sobrevivência e cálculo de valores p por Log-rank ( Mantel-Cox) test. Dois experimentos foram realizados.



### 3.11 Ensaio de Resistência ao Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi induzido por uma concentração aguda e letal de *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH), um peróxido orgânico. Animais tipo selvagem N2 e os mutantes *skn-1(zu67)*, *daf-16(mu86)*, *nsy-1(ag3)*, *sek-1(km4)*, *jnk-1(gk7)*, *osr-1(rm1)*, *pmk-1(km25)*, *mpk-1(ku1)/unc-32(e189)* e *unc-43(n498n1186)* foram sincronizados e as larvas L1 colocadas em placas contendo ou não extrato de *B. trimera* e deixadas crescer por 48h a 20°C até o estágio L4. Os animais tratados ou não com *B. trimera* foram transferidos para solução de M9 contendo 7,5 mM de *t*-BOOH, para os experimentos com bactéria viva e bactéria tratada com kan, ou 12 mM de *t*-BOOH, para os experimentos com RNAi. Cada experimento foi realizado em placas de 24 poços, onde 50 animais por grupo foram distribuídos em 5 poços com 10 animais por poço. A viabilidade dos animais foi analisada após 6, 9 e 12 horas usando uma lupa estereoscópica para contar o número de animais mortos, que são determinados pela ausência de batimento faríngeo e de movimento quando provocados com uma alça de fio de platina (LITHGOW *et al.*, 1995). Três experimentos foram realizados.

### 3.12 Quantificação de ERO Intracelular no *C. elegans*

A produção de ERO intracelular no *C. elegans* foi medida usando a sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidro-fluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA). Animais tipo selvagem sincronizados em L1 foram tratados ou não com 50 mg/mL de EHB por 48 h e então transferidos para 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou não por 1 h. Os vermes foram coletados em 1 mL de PBS com 1% Tween-20 (PBST), lavados duas vezes e transferidos para placas de 96 poços contendo 50 µM H<sub>2</sub>DCF-DA. As amostras foram lidas a cada 30 min por 6 h em um leitor de microplacas (Perkin Elmer VICTOR X3, MA, USA) a 37°C, excitação 485 nm e emissão 535 nm. Três experimentos foram realizados.

### 3.13 Análise de Genes Repórteres

Foi investigado se o tratamento com EHB promove um aumento dos níveis de expressão de genes que codificam enzimas da fase 2 de detoxificação. Foram analisadas três linhagens transgênicas contendo genes repórteres para os seguintes genes:  $\gamma$ -

glutamil-cisteína sintetase N2 Is003 (*gcs-1::GFP*), glutathione transferase N2 dvls19[pAF15(*gst-4::GFP::NLS*)] e superóxido dismutase N2 mul84[pAD76(*sod-3::GFP*)]. Estes três genes são ativados por diferentes condições de estresse e são regulados diretamente por SKN-1 e DAF-16 (MURPHY *et al.*, 2003; AN; BLACKWELL, 2003). Os animais foram tratados por 46-48 h com solução controle, 5 e 50 mg/mL de EHB. Logo após foram colocados durante 1 h em meio líquido M9 ou M9 + 7,5 mM de *t*-BOOH mantidos a 20°C sob agitação. Após este período, foram lavados e transferidos para placas contendo NGM e *E. coli* OP50, onde permaneceram por 1 h. As linhagens transgênicas *hsp-16.2::GFP* e *hsp-4::GFP* foram tratadas ou não com 50 mg/mL de EHB e então transferidas ou não para 35°C por 1 h. Após este período foram mantidos a 20°C por 1 h e 30 min para recuperação. Após o período de recuperação 20 animais foram colocados em lâminas contendo uma fina camada de 2% de agarose, imobilizados com 2% de azida sódica e cobertos com uma lamínula. Os animais transgênicos foram visualizados através de microscópio fluorescente ZEISS, disponível no Núcleo de Pesquisas em Ciências biológicas (NUPEB) da UFOP, usando aumento ocular de 10 vezes e filtro para excitação de 365 nm para obtenção das fotomicrografias. Os níveis de ativação da expressão gênica foram avaliados através da intensidade da fluorescência medida de forma densitométrica. Os sinais de fluorescência GFP dos animais individuais foram medidos com um analisador de imagem ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) e os valores obtidos em pixels/área foram usados para construção dos gráficos. Três experimentos foram realizados.

### **3.14 Ensaio de Paralisia Induzida pelo Peptídeo $\beta$ -amilóide**

Para determinar se o EHB suprime ou retarda o início da paralisia progressiva induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide, foi utilizada a linhagem CL4176 que expressa o A $\beta$  1-42 específico no músculo. A sincronização foi feita por ovoposição em placas de NGM contendo 50 mg/mL EHB ou solução controle e incubadas por 40 h a 16°C. Para iniciar a paralisia induzida pelo amilóide, os vermes foram transferidos pra 25°C. Após 24 h a 25°C, a paralisia foi verificada a cada 2 h. Os vermes foram classificados como "paralisados", baseado na incapacidade de moverem os corpos quando tocados por uma alça de platina ou na formação de um halo sobre a camada de bactérias, o que indica

uma condição de paralisia. Cada experimento foi realizado utilizando, pelo menos, 40 vermes. Foram realizados três experimentos

### **3.15 Coloração pelo Vermelho Nilo**

O vermelho Nilo é um corante que tem afinidade por gotas de lipídeos. As placas de NGM foram preparadas contendo 100 ng/mL de vermelho Nilo e mantidas a 37°C overnight. Nestas placas, foi semeada *E. coli* OP50 misturada ou não com 50 mg/mL EHB. Animais tipo selvagem sincronizados em L1 foram cresceram nestas placas por 48 h. 20 vermes de cada grupo foram fotografados em um microscópio fluorescente (Zeiss Axio Imager Z2, NY, USA) usando uma ocular de 10X. Os sinais de fluorescência foram medidos usando o software NIH Image J. Três experimentos foram realizados.

### **3.16 Atividade do Proteassoma**

Para o preparo do extrato bruto de proteínas aproximadamente 5000 animais tipo selvagem foram crescidos em placas contendo ou não 50 mg/mL de EHB por 48h a 20°C, até que atingissem o estágio larval de L4. Esses animais foram recolhidos por lavagem em tampão M9. Depois de retirado o excesso de M9 foi adicionado um volume do tampão de homogeneização (Tris-HCl 5mM, pH 8.0, glicerol 1%, EDTA 1 mM), correspondendo a 3 vezes o peso úmido dos animais, e 10 µL do coquetel de inibidores de proteases Amresco (código M221). O material foi homogenizado por sonicação, com cinco pulsos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos, em seguida, centrifugado por 30 minutos a 20000G, conforme protocolo estabelecido por Cabreiro *et al.* (2011). Ao sobrenadante, foi adicionado glicerol para uma concentração final de 20%. O extrato foi armazenado a -80°C para análises posteriores. A determinação da concentração proteica presente no extrato bruto foi realizada utilizando o princípio do ácido bicinconínico (BCA), segundo as recomendações do fabricante (QuantiPro™ BCA Assay Kit – SIGMA ALDRICH). O princípio do método BCA se baseia na formação de um complexo proteína-Cu<sup>2+</sup>, sob condições alcalinas, seguido da redução de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup>. A quantidade da redução é proporcional à quantidade de proteínas presentes. O

BCA forma um complexo roxo-azulado com o  $\text{Cu}^{1+}$ , fornecendo então a base para o monitoramento da redução de  $\text{Cu}^{2+}$  pelas proteínas.

Para a determinação da atividade peptidásica do proteossoma presente na fração citosólica de vermes foi utilizado o substrato fluorogênico Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-4-metil-cumaril-7-amida (SLLVT-MCA). Nesses ensaios foram utilizadas 25 $\mu\text{g}$  de proteínas totais para cada extrato, o tampão  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 1mM, Tris-HCl 50mM pH 8,0 e 13  $\mu\text{M}$  de substrato (para atividade de quimiotripsina) na presença ou não do inibidor MG132 (Cbz-Leu-Leu-Leucinal) 20  $\mu\text{M}$ . O ensaio foi realizado num volume final de 240  $\mu\text{L}$  e a incubação realizada durante 60 minutos a 37°C. As leituras de fluorescência foram realizadas a cada 30 minutos pelo leitor de microplacas VICTOR X3 (Perkin Elmer, MA, USA), nos comprimentos de onda de 380 nm (excitação) e 440 nm (emissão). A atividade do proteossoma foi determinada como a diferença entre as atividades mensuradas na ausência e na presença do inibidor MG132, uma vez que este possui atividade inibidora específica da atividade do proteossoma.

### **3.17 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (CA, USA) e o SAS JMP versão 10.0 (NC, USA). Os resultados foram representados como a média  $\pm$  SEM de três experimentos individuais. Para verificar se os dados apresentavam distribuição normal foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov. Para dados com distribuição normal, o teste t de Student's foi usado para comparar dois grupos, enquanto ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Tukey foi usado para comparar três ou mais grupos. Já os dados não paramétricos foram analisados usando o Mann-Whitney teste quando dois grupos foram comparados ou Kruskal-Wallis teste seguido pelo Dunn's pós-teste para comparar três ou mais grupos. Todas as curvas de sobrevivência foram analisadas pelo Log-rank (Mantel-Cox) teste. Diferença estatística significativa foi determinada como  $p < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização do EHB

Primeiramente realizamos uma caracterização do EHB em relação à quantidade de polifenóis totais e capacidade antioxidante *in vitro*. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por litro de extrato hidroalcoólico (mg EAG/L). O valor encontrado foi de  $0.085 \pm 0.001$  mg EAG/L, enquanto Pádua encontrou 1,06 mg EAG/ml (PÁDUA *et al.*, dados não publicados).

A capacidade de três concentrações de EHB 0,5, 5 e 50 mg/mL em neutralizar o radical DPPH também foi determinada. A capacidade de uma dada amostra em reduzir a absorvância do DPPH indica a sua capacidade em neutralizar os radicais livres. Nós observamos que a concentração 0,5 mg/mL de EHB mostrou um percentual de inibição de 19,95. Já as concentrações 5 e 50 mg/mL de EHB exibiram uma inibição de 74% e 82%, respectivamente, comparados ao Trolox (Tabela 1). Nós também avaliamos o metabolismo da bactéria na capacidade antioxidante do EHB. O percentual de inibição para 0,5 mg/mL de EHB foi reduzido de 19,95% para 7,17% quando o extrato foi misturado com *E.coli* OP50. O pré-tratamento com kan antes de misturar com o EHB restaurou a capacidade de inibição do DPPH para 20,82% (Tabela 1). A percentagem de inibição para 5 e 50 mg/mL de EHB não foi significativamente alterada quando os extratos foram misturados com bactéria (Tabela 1). Estes resultados indicam que o metabolismo da bactéria interfere na capacidade antioxidante na concentração mais baixa de EHB (0,5 mg/mL), mas não nas maiores testadas (5 e 50 mg/mL).

### 4.2 Análise da Sobrevivência do *C. elegans* Tratado com EHB em Condições Normais

Nós primeiro testamos se o EHB poderia afetar a sobrevivência do *C. elegans* sob condições padrões de laboratório. Os ensaios de longevidade foram realizados com animais *fem-1* tratados com três diferentes concentrações de EHB (0,5, 5, e 50 mg/mL) a 25°C. A Figura 3A mostra que o tratamento com as diferentes concentrações de EHB não alterou o tempo de vida médio ( $p < 0.42$  para 0,5 mg/mL;  $p < 0.82$  para 5 mg/mL; e

**Tabela 1.** Capacidade antioxidante do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) e Trolox *in vitro* pelo ensaio do DPPH.

	% inibição (Média ± SEM)		
	-	+OP50	+OP50+KAN
<b>EHB (mg/ml)</b>			
0.5	19.95 ± 0.25	7.17 ± 0.45	20.82 ± 0.05
5	74.27 ± 0.35	71.38 ± 0.29	73.43 ± 0.22
50	82.86 ± 0.25	85.35 ± 0.21	87.57 ± 0.71
<b>Trolox<sup>a</sup> (µM)</b>			
100	18.94 ± 0.46	n.d.	n.d.
300	38.05 ± 1.24	n.d.	n.d.
400	54.04 ± 0.46	n.d.	n.d.
700	81.37 ± 0.31	n.d.	n.d.

<sup>a</sup>Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

<sup>n.d.</sup> não determinado

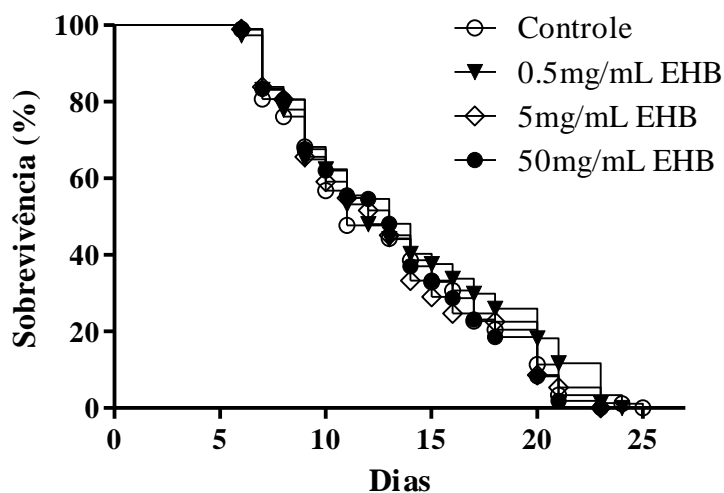
$p < 0.69$  para 50 mg/mL). Estes resultados indicam que sob condições padrões, o tratamento com EHB não alterou o tempo de vida do *C. elegans* (Figura 3 e Tabela 2).

#### **4.3 Análise do Efeito do Tratamento com EHB na Sobrevivência do *C. elegans* em Condições de Estresse Oxidativo**

Sabe-se que a *B. trimera* possui atividade antioxidante *in vitro*, entretanto nenhum modelo *in vivo* ainda foi testado para avaliar as propriedades antioxidantes da *B. trimera* sob condições de estresse oxidativo. Para explorar se o EHB tem um efeito protetor *in vivo*, ensaios de estresse oxidativo foram realizados com animais tipo selvagem tratados com três diferentes concentrações de EHB (0.5, 5 e 50 mg/mL) por 48 h. Nós observamos que os animais tratados com 50 mg/mL EHB apresentaram um aumento na resistência ao estresse oxidativo quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.0001$ ). Surpreendentemente, animais tratados com 0.5 mg/mL EHB apresentaram uma diminuição da resistência ao estresse oxidativo ( $p = 0.009$ ), enquanto no grupo tratado com 5 mg/mL EHB não alterou a resistência ao estresse oxidativo comparado ao controle (Figura 4 e Tabela 3).

#### **4.4 Avaliação do Efeito do EHB no Crescimento da *E. coli* OP50**

Sabe-se que a *E. coli* tem efeito patogênico no *C. elegans* podendo alterar sua longevidade e resistência ao estresse (KIM, 2013). Então nós investigamos se o efeito protetor do EHB observado sob condições de estresse (Figura 4) poderia ser resultado da inibição do crescimento bacteriano. O pellet de *E. coli* OP50 foi ressuspendido com LB sozinho ou contendo 0.5, 5 e 50 mg/mL de EHB. As leituras foram feitas no espectrofotômetro a cada 40 minutos durante 5 h e a OD inicial foi de aproximadamente 0.05. Nós observamos que todas as três concentrações de EHB mostraram efeito bacteriostático. Este efeito foi observado após 80 min de incubação com 50 mg/mL de EHB, e depois de 120 e 200 min de incubação com 5 e 0.5 mg/mL de EHB, respectivamente (Figura 5).



**Figura 3.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na sobrevivência do *C. elegans* sob condições padrões de laboratório. Animais mutantes *fem-1(hc17)* foram tratados ou não com três diferentes concentrações de EHB (0.5, 5, e 50 mg/mL) e mantidos a 25°C desde L1. A sobrevivência foi verificada diariamente até que todos os nematódeos estivessem mortos. Análise pelo Log-rank (Mantel-Cox) não mostrou nenhuma diferença entre as curvas.

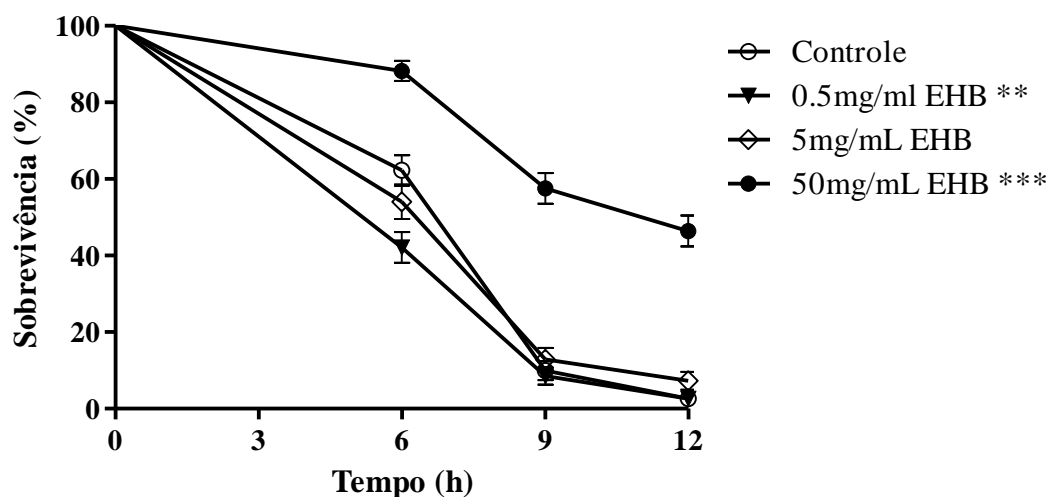
**Tabela 2.** Efeito do tratamento com o Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na sobrevivência de *C. elegans* mutantes *fem-1* a 25°C

	Taxa de sobrevivência (dias)			P vs. Controle (log-rank) <sup>b</sup>	n <sup>a</sup>
	Média	Mediana	Máxima		
Controle	13.09	11	18.1		88 (2)
0.5 mg/mL EHB	13.75	12	18.3	0.42	77 (2)
5 mg/mL EHB	13.08	13	19.5	0.82	93 (2)
50 mg/mL EHB	13.21	13	18.4	0.69	108 (2)

<sup>a</sup> número total de animais analisados. O número entre parênteses indica o número de experimentos individuais.

<sup>b</sup> O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para comparar os grupos





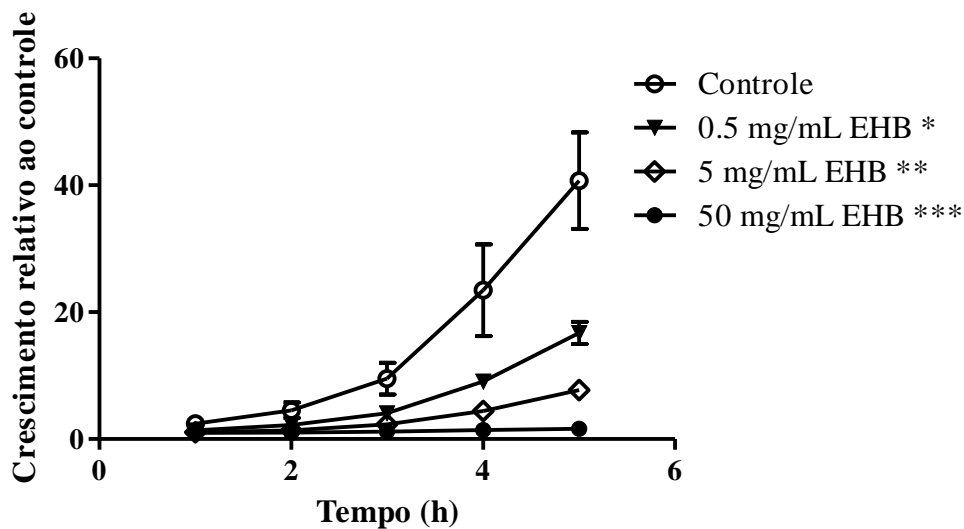
**Figura 4.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na sobrevivência do *C. elegans* sob condições de estresse. Animais tipo selvagem foram tratados ou não com três diferentes concentrações de EHB desde L1 até L4 e então submetidos a 7.5 mM t-BOOH em M9. A sobrevivência foi verificada 6, 9 e 12 h após o início do estresse. As curvas de sobrevivência mostraram que somente o tratamento com 50 mg/mL de EHB aumentou a resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans*, enquanto 0.5 mg/ml de EHB diminuiu a resistência ao estresse. \*\*\* $p < 0.001$  e \*\* $p = 0.009$  pelo teste Log-rank (Mantel-Cox).

**Tabela 3.** Efeito do tratamento com Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* tratados com OP50

	Taxa de sobrevivência média (horas)	P vs. Controle (log-rank) <sup>b</sup>	n <sup>a</sup>
<b><i>E. coli</i> OP50</b>			
Controle	8.16		151 (3)
0.5 mg/mL EHB	7.52	0.0090	152 (3)
5 mg/mL EHB	7.98	0.9668	124 (3)
50 mg/mL EHB	10.37	<0.0001	153 (3)

<sup>a</sup> número total de animais analisados. O número entre parênteses indica o número de experimentos individuais.

<sup>b</sup> O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para comparar os grupos



**Figura 5.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) no crescimento da *E. coli*. O crescimento da *E. coli* OP50 foi avaliado por 5 h na presença de três concentrações de EHB (0.5, 5, e 50 mg/mL). A OD do grupo controle no tempo zero foi usada para normalizar as outras leituras de OD. \* Tratamento com 0.5 mg/mL de EHB diminuiu o crescimento bacteriano depois de 200 min. \*\* Tratamento com 5 mg/mL de EHB diminuiu o crescimento bacteriano depois de 120 min. \*\*\* Tratamento com 50 mg/mL de EHB diminuiu o crescimento bacteriano depois de 80 min.  $p < 0.05$ , determinado pelo teste t de Student bi-caudal.

#### **4.5 Análise do Efeito do Tratamento com EHB na Sobrevivência do *C. elegans* Alimentado com Bactéria Morta em Condições de Estresse Oxidativo**

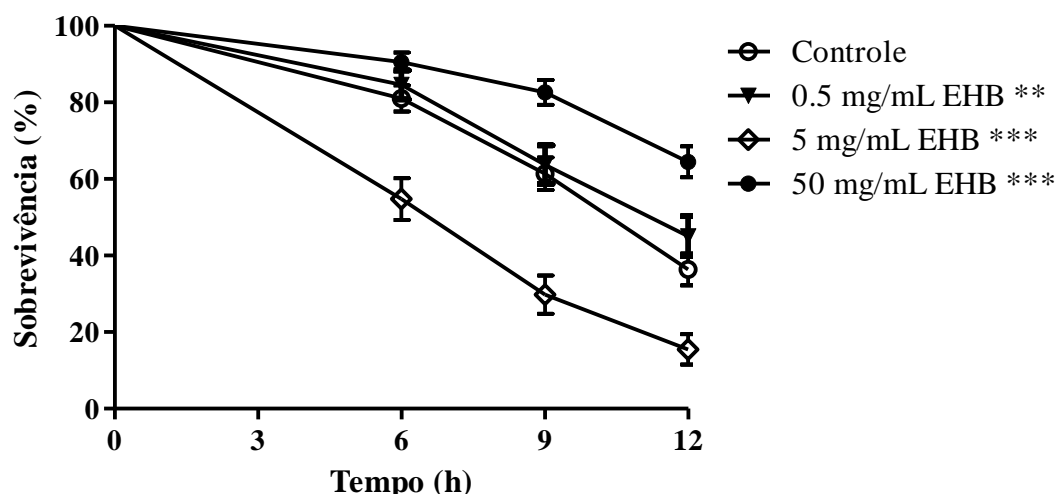
Para verificar se o efeito bacteriostático do EHB altera a capacidade antioxidante do EHB *in vivo*, realizamos os ensaios de estresse oxidativo com *E. coli* OP50 morta pelo antibiótico Kan. Os animais tipo selvagem sincronizados em L1 foram mantidos por 48 h em placas de bactéria morta contendo ou não EHB e expostos a 7.5 mM de t-BOOH. Nós observamos que o tratamento com 50 mg/mL EHB ainda aumentou a resistência ao estresse oxidativo, indicando que a propriedade bacteriostática do EHB não é o único fator afetando a resistência ao estresse oxidativo nestes animais. Não foi observado aumento da resistência ao estresse oxidativo nos animais tratados com as outras concentrações de EHB (0.5 e 5 mg/mL CHE) (Figura 6 e tabela 4). Baseado nestes resultados, nós decidimos realizar os próximos experimentos usando 50 mg/mL de EHB.

#### **4.6 Análise do Efeito do EHB sobre o Tamanho Corporal e Progênie**

Sabe-se que em resposta a fatores ambientais adversos, recursos energéticos são redirecionados para diferentes processos do desenvolvimento tais como crescimento e reprodução (VILCHEZ *et al.*, 2012). Para verificar se o tratamento com EHB poderia afetar o crescimento e a reprodução do *C. elegans*, nós avaliamos o tamanho corporal e a progênie dos animais tratados com 50 mg/mL de EHB. Não houve diferença estatística no tamanho corporal dos animais tratados em relação ao controle ( $p=0.100$ ) (Figura 7A). Nós também não observamos nenhuma diferença na progênie total entre os grupos controle e tratado. Além disso, o tratamento com 50 mg/mL de EHB não alterou o perfil diário de ovoposição dos animais (Figura 7B).

#### **4.7 Avaliação do Efeito do EHB sobre o Batimento Faríngeo**

Para saber se o EHB altera o comportamento alimentar do *C. elegans*, nós quantificamos a taxa de batimento faríngeo. Animais tipo selvagem sincronizados em L1 cresceram por 48 h em placas contendo ou não 50 mg/mL de EHB. A frequência de batimento não foi significativamente diferente entre os grupos, indicando que o EHB não altera a ingestão alimentar do *C. elegans* (Figura 8).



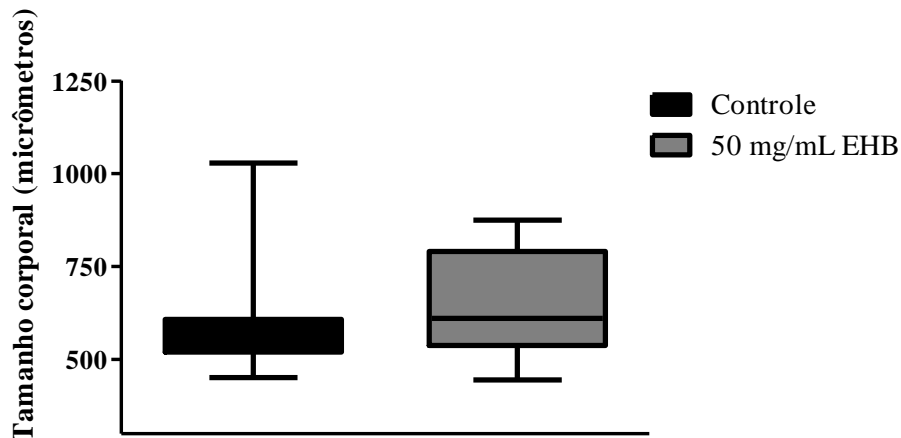
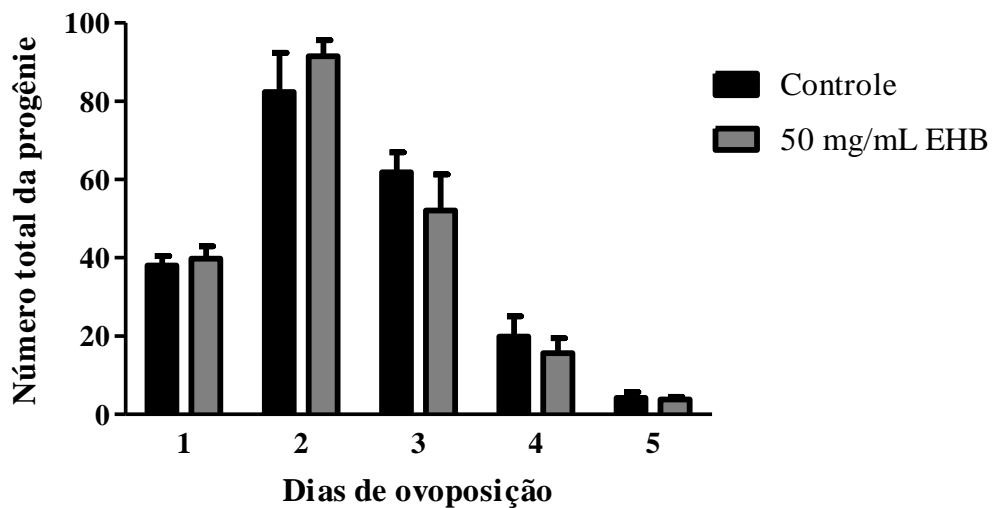
**Figura 6.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse oxidativo de *C. elegans* alimentado com bactéria tratada com kanamicina. Animais tipo selvagem foram tratados ou não com três diferentes concentrações de EHB (0.5, 5, e 50 mg/mL) misturadas com *E. coli* OP50 tratada com 10 mM KAN de L1 até L4 e então submetido a 7.5 mM t-BOOH em M9. A sobrevivência foi avaliada após 6, 9 e 12 h. As curvas de sobrevivência mostram que o tratamento com 50 mg/mL de EHB aumentou a resistência ao estresse oxidativo independente do efeito antibacteriano. \*\*\* $p < 0.001$  relacionado ao controle pelo Log-rank (Mantel-Cox) teste.

**Tabela 4.** Efeito do tratamento com Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* tratados com OP50 morta

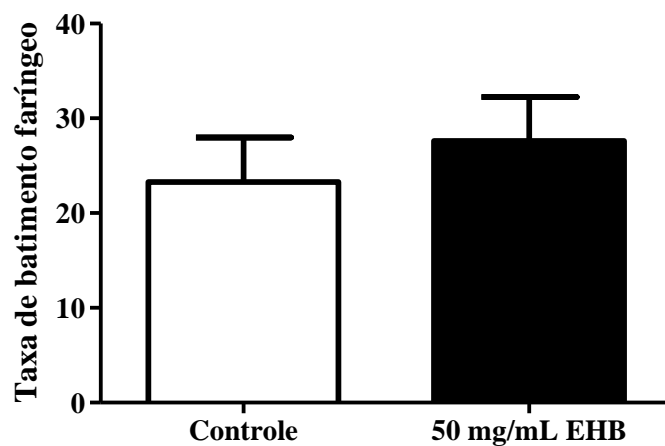
	Taxa de sobrevivência média (horas)	P vs. Controle (log-rank) <sup>b</sup>	n <sup>a</sup>
<b><i>E. coli</i> OP50 + Kan</b>			
Controle	10.27		132 (3)
0.5 mg/mL EHB	10.45	0.251	91 (3)
5 mg/mL EHB	8.53	<0.0001	84 (3)
50 mg/mL EHB	11.19	<0.0001	138 (3)

<sup>a</sup> número total de animais analisados. O número entre parênteses indica o número de experimentos individuais.

<sup>b</sup> O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para comparar os grupos

**A****B**

**Figura 7.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) no crescimento e na reprodução do *C. elegans*. A) Tamanho corporal. Animais L1 foram tratados ou não com 50 mg/mL de EHB por 48 h. Os animais foram fotografados e o tamanho corporal foi medido usando o software AxioVision Rel. 4.8. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste t de Student bi-caudal. B) Tamanho da progênie. O perfil da progênie foi medido em animais tratados ou não com 50 mg/mL de EHB. Os animais foram transferidos individualmente para novas placas de NGM e movidos diariamente até o fim do período reprodutivo. Os resultados foram plotados como média  $\pm$  SEM para cada dia. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste t de Student bi-caudal.



**Figura 8.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) no batimento faríngeo do *C. elegans*. A taxa de batimento faríngeo foi quantificado em animais tipo selvagem tratados ou não com 50 mg/mL de EHB. Não houve diferença estatística entre os grupos determinado pelo teste t de Student bi-caudal.

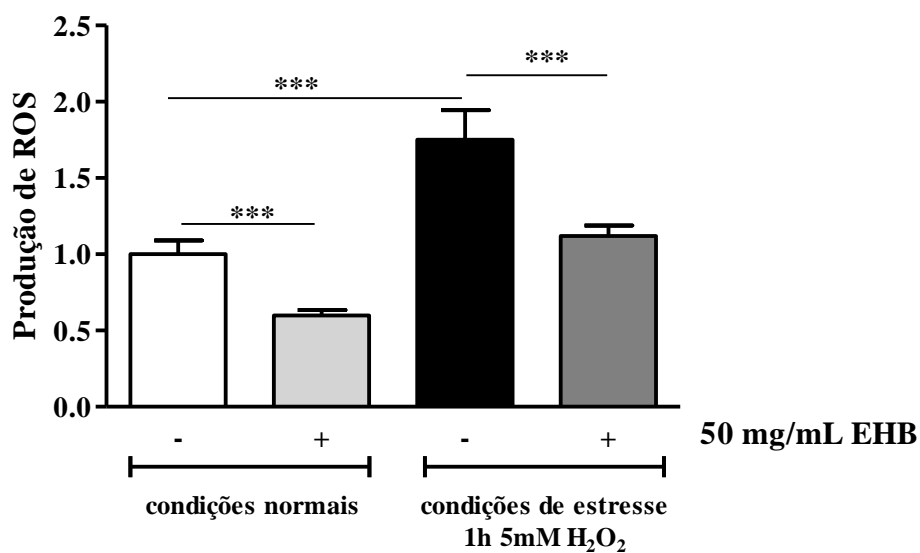
#### 4.8 Análise do Efeito do EHB Sobre a Produção Intracelular de ERO

Fitoquímicos antioxidantes podem agir tanto diretamente neutralizando as ERO ou indiretamente através da modulação de vias de sinalização. Para investigar se o efeito protetor de 50 mg/mL EHB nos *C. elegans* tratados é por ação direta ou indireta, nós medimos a produção de ERO intracelular, a expressão de enzimas antioxidantes e realizamos ensaios de estresse oxidativo com mutantes de diferentes vias de sinalização de resposta ao estresse oxidativo.

Para a determinação de ERO, os animais tipo selvagem foram crescidos por 48 h, desde L1 até L4, em placas contendo ou não 50 mg/mL EHB. Logo depois os animais foram transferidos para meio líquido M9 ou 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 h. Utilizando uma sonda fluorescente foi possível quantificar a produção de ERO. Nós observamos que o tratamento com EHB diminuiu a produção de ERO tanto sob condições padrões quanto sob condições de estresse (Figura 9).

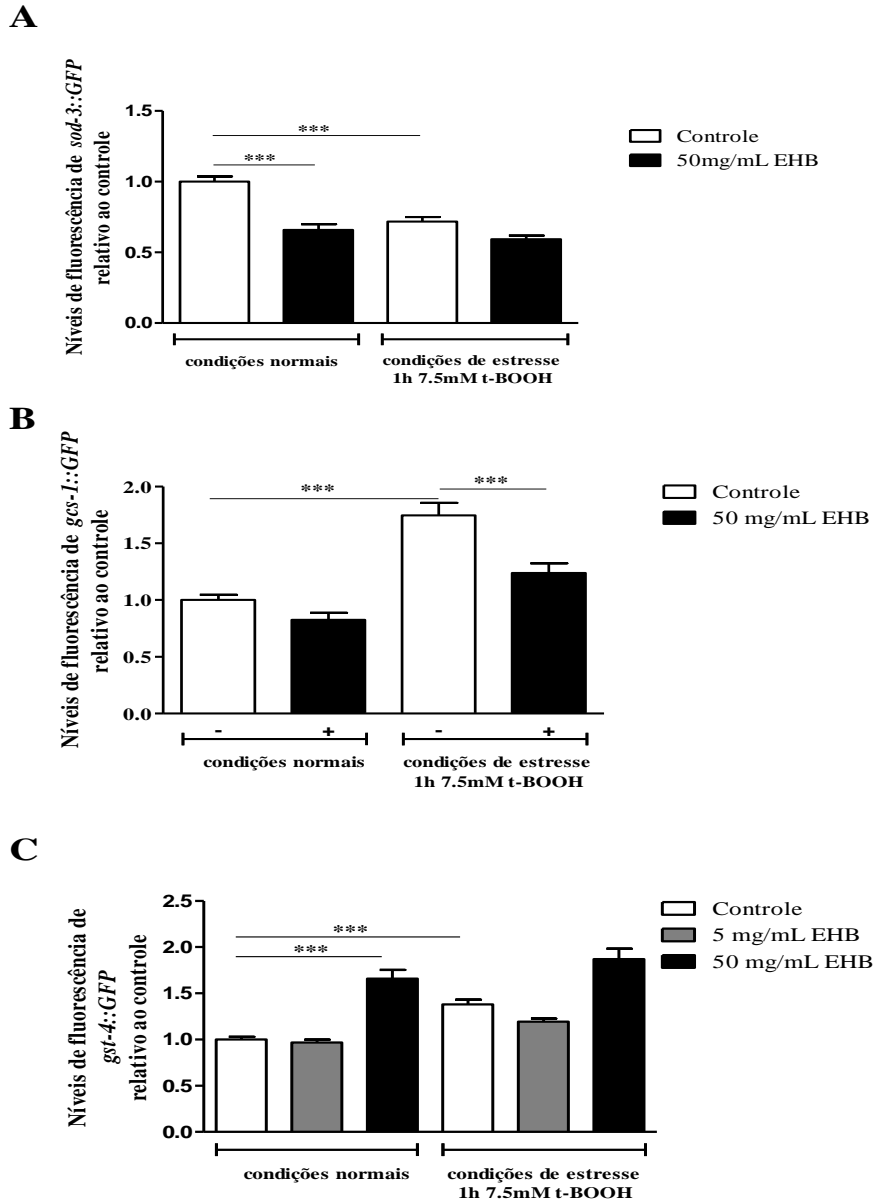
#### 4.9 Análise do Efeito do EHB sobre a Expressão Gênica

Três genes repórteres foram utilizados para analisar a expressão gênica. Esses genes codificam importantes enzimas de detoxificação:  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetase (*gcs-1::GFP*) e glutathione transferase (*gst-4::GFP*) e superóxido dismutase (*sod-3::GFP*). Como nós observamos uma proteção do EHB contra o estresse oxidativo e nenhum efeito sob condições normais, esses ensaios foram realizados também na presença de estresse. Os animais foram tratados por 46-48 h com solução controle, 5 ou 50 mg/mL de EHB e depois mantidos por 1 h em meio líquido M9 ou 7,5 mM de *t*-BOOH. O tratamento com 50 mg/mL de EHB reduziu a expressão de *sod-3::GFP* em relação ao grupo controle sob condições padrões de laboratório, mas nenhuma diferença foi observada entre os grupos sob condições de estresse (Figura 10A). A Figura 10B mostra que sob condições de estresse, o tratamento com 50 mg/mL de EHB reduziu a expressão de *gcs-1::GFP* comparado ao grupo controle, mas nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais controle e tratado sob condições normais (Figura 10B). O tratamento com 50 mg/mL EHB aumentou a expressão de *gst-4::GFP* comparado ao grupo controle sob condições normais. Nos animais expostos ao estresse, nenhuma diferença foi observada entre os grupos controle e tratado (Figura 10C).



**Figure 9.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na produção de ERO no *C. elegans*. Animais tipo selvagem foram tratados ou não com 50 mg/mL de EHB por 48 h e então submetidos a solução controle ou 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 h. EHB reduziu a produção de ERO tanto sob condições normais quanto de estresse. \*\*\*p<0.0001 determinado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn.





**Figure 10.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na expressão de *sod-3::GFP* (A), *gcs-1::GFP* (B), e *gst-4::GFP* (C). Animais transgênicos foram tratados ou não com 50mg/mL de EHB por 48 h desde L1 até L4 e então submetidos ou não ao estresse oxidativo. Depois de 1 h de recuperação, fotografias foram retiradas por um microscópio fluorescente e os sinais de fluorescência GFP foram quantificados usando o software Image J. A) A expressão de *sod-3::GFP* foi menor nos animais tratados com 50 mg/mL EHB sob condições normais. B) O tratamento com EHB reduziu a expressão de *gcs-1::GFP* sob condições de estresse. C) A expressão de *gst-4::GFP* aumentou no grupo tratado com 50 mg/mL de EHB sob condições padrões. \*\*\* $p < 0.0001$  pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn.

Estes resultados sugerem que o EHB inibe a expressão de *sod-3::GFP* sob condições padrões e *gcs-1::GFP* sob condições de estresse enquanto ativa a expressão de *gst-4::GFP* sob condições padrões.

#### **4.10 Avaliação da Participação de Diferentes Vias de Sinalização sobre o Aumento da Resistência ao Estresse Promovido pelo EHB**

Para investigar se vias de sinalização de resposta ao estresse poderiam ter um papel na atividade antioxidante do EHB, nós realizamos o ensaio de estresse oxidativo com animais tipo selvagem, animais mutantes para os fatores de transcrição DAF-16 e SKN-1, e diferentes mutantes das seguintes vias de sinalização de resposta ao estresse: p38, JNK e ERK MAPK. Todos os animais foram tratados ou não com 50 mg/mL de EHB por 48 h, desde L1 até L4 e então expostos a 7,5 mM de t-BOOH. Todos os mutantes tratados com 50 mg/mL de EHB mostraram um aumento da resistência ao estresse oxidativo comparado aos seus respectivos controles (Tabela 5). Como EHB possui efeito antimicrobiano, nós repetimos os ensaios de estresse oxidativo agora com bactéria morta para os mutantes *nsy-1*, *jnk-1* e *mpk-1* que mostraram o menor aumento na sobrevivência média nos experimentos com bactéria viva. Mesmo tratados com EHB misturado com bactéria morta por Kan os mutantes exibiram um aumento na resistência ao estresse oxidativo (Tabela 5). Assim, a ideia de que o efeito antibacteriano aumentasse a resistência ao estresse foi rejeitado de novo. Isto indica fortemente que a resistência ao estresse induzida pelo EHB não foi mediada pelas vias de sinalização de resposta ao estresse e fatores de transcrição aqui testados.

Para descartar a possibilidade de uma via não funcional poder ser compensada por uma funcional, nós testamos o duplo knockdown de SKN-1 e DAF-16 simultaneamente. Nós observamos que os animais *skn-1(RNAi);daf-16(RNAi)* tratados com 50 mg/mL EHB ainda mostraram um aumento na resistência ao estresse oxidativo comparado ao seu respectivo controle (Tabela 5).

**Tabela 5.** Efeito do tratamento com 50 mg/mL de Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* tipo selvagem e mutantes.

	Taxa de sobrevivência média		P vs. Controle (log-rank) <sup>b</sup>	n <sup>a</sup>	
	Controle	Tratado		Controle	Tratado
<b><i>E. coli</i> OP50</b>					
N2	9.6	10.8	<0.0001	669 (13)	645 (13)
<i>nsy-1(ag3)</i>	7.6	8.8	<0.0001	154 (3)	160 (3)
<i>pmk-1(ku25)</i>	7.3	8.7	<0.0001	152 (3)	154 (3)
<i>sek-1(km4)</i>	7.1	9.0	<0.0001	147 (3)	158 (3)
<i>skn-1(zu67)</i>	6.5	9.6	<0.0001	131 (3)	133 (3)
<i>daf-16(mu86)</i>	8.2	10.0	<0.0001	159 (3)	155 (3)
<i>jnk-1(gk7)</i>	9.0	9.9	<0.0001	153 (3)	152 (3)
<i>osr-1(rm-1)</i>	8.4	9.7	<0.0001	154 (3)	154 (3)
<i>unc-43(n498n1186)</i>	8.5	9.7	<0.0001	149 (3)	130 (3)
<i>mpk-1(ku1)</i>	7.5	9.3	<0.0001	158 (3)	161 (3)
N2 control(RNAi)	10.45	11.26	<0.0001	146 (3)	150 (3)
N2 <i>skn-1(RNAi);daf-16(RNAi)</i>	8.12	10.40	<0.0001	134 (3)	146 (3)
<b><i>E. coli</i> OP50 + KAN</b>					
N2	10.32	11.15	<0.0001	306 (6)	283 (6)
<i>nsy-1(ag3)</i>	9.39	10.67	<0.0001	100 (2)	99 (2)
<i>jnk-1(gk7)</i>	9.89	10.51	<0.0024	98 (2)	99 (2)
<i>mpk-1(ku1)</i>	8.64	9.83	<0.0014	76 (2)	94 (2)

<sup>a</sup> número total de animais analisados. O número entre parênteses indica o número de experimentos individuais.

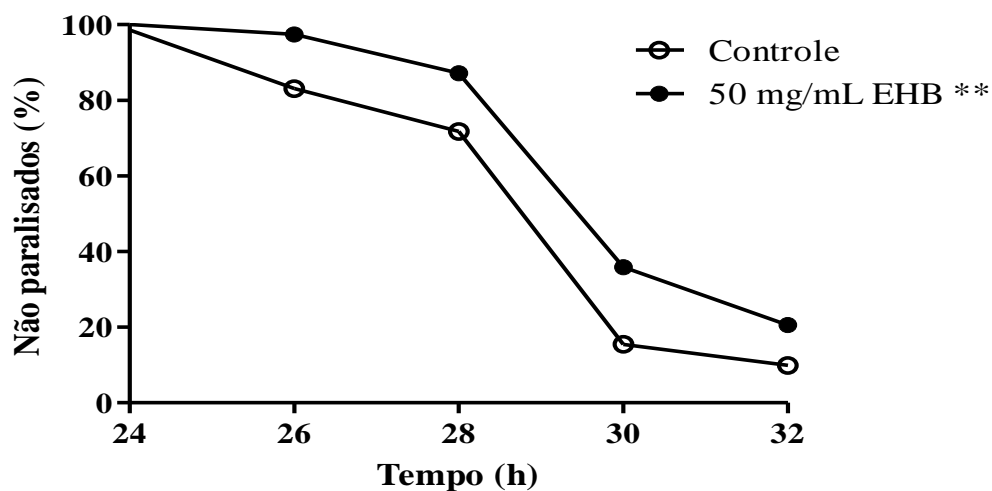
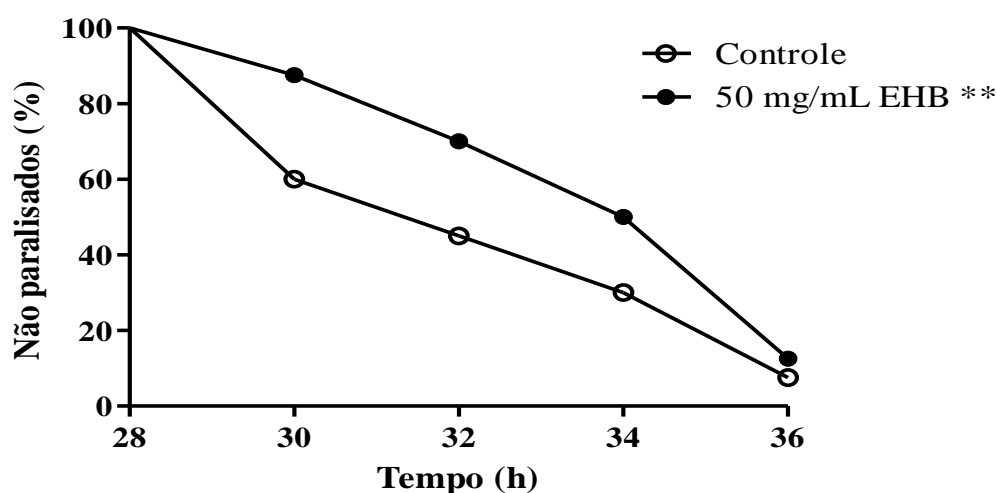
<sup>b</sup> O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para comparar os grupos

#### **4.11 Avaliação da Paralisia Induzida pelo Peptídeo $\beta$ -amilóide**

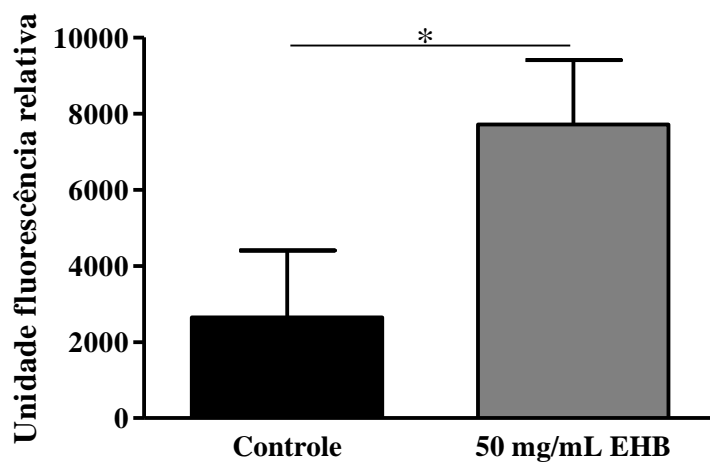
O estresse oxidativo tem um importante papel no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer (AD) e Parkinson. O acúmulo de ERO e a deposição de espécies amilóides tóxicas têm sido propostos exacerbar os sintomas observados em pacientes com AD (CHOI, 2014). Em *C. elegans*, o estresse oxidativo é fortemente correlacionado com a toxicidade do peptídeo A $\beta$ , e tem sido mostrado que produtos naturais que reduzem a produção de ROS são neuroprotetivos (SANGHA, 2012; MARTORELL, 2013). A observação que o EHB possui propriedades antioxidantes *in vivo* levou-nos a perguntar se o tratamento com EHB poderia ter um efeito protetor contra a toxicidade do  $\beta$ -amilóide em um modelo de *C. elegans* para DA. A expressão do A $\beta$ 1–42 de humanos nos músculos do transgênico CL4176 promove uma paralisia que pode ser monitorada ao longo do tempo. Nós observamos que o início da paralisia foi significativamente adiada em animais tratados com 50 mg/mL de EHB em relação ao controle (p=0.0029). Após 24 h de indução da expressão do A $\beta$ 1–42 todos os animais foram responsivos ao toque. Depois de 32 h, este efeito foi ainda observado em 20% dos animais tratados com EHB, comparados a somente 9% nos animais do grupo controle (Figura 11A). Este efeito foi também independente do efeito antimicrobiano do EHB. Depois de 36 h, 50% dos animais tratados com EHB misturado com *E.coli* morta por kan ainda foram responsivos ao toque comparado a 30% dos animais do grupo controle (p=0.0353) (Figura 11B).

#### **4.12 Avaliação da Atividade do Proteassoma**

A alteração da homeostase protéica constitui a base para a patologia de muitas desordens neurodegenerativas (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011). Para avaliar se o tratamento com EHB altera a homeostase proteica nós mensuramos a atividade do proteassoma em animais tratados ou não com 50 mg/mL de EHB. A atividade do proteassoma foi monitorada pela digestão do substrato fluorogênico SLLVY-MCA em extrato proteico de animais tipo selvagem L4 contendo a mesma quantidade de proteínas. O EHB aumentou a atividade de degradação proteassomal em cinco vezes em relação ao controle (p<0.05) (Figura 12).

**A****B**

**Figura 11.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) em um modelo transgênico de *C. elegans* para doença de Alzheimer. A linhagem transgênica CL4176 tratado ou não com 50 mg/mL de EHB foi incubada a 16°C por 40 h. Para iniciar a paralisia induzida pelo  $\beta$ -amilóide, os vermes foram transferidos de 16°C para 25°C. A paralisia foi verificada a cada 2 h após 24 h a 25°C. As curvas de sobrevivência mostram que o EHB alivia a paralisia induzida pelo  $\beta$ -amilóide. A) Perfil da paralisia dos animais transgênicos CL4176 alimentados com 50 mg/mL of de EHB. \*\* $p=0.0029$  pelo Log-rank (Mantel-Cox) teste. B) Perfil da paralisia dos animais transgênicos CL4176 alimentados com 50 mg/mL de EHB misturado com bactéria tratada com KAN. \* $p=0.0353$  pelo Log-rank (Mantel-Cox) teste.



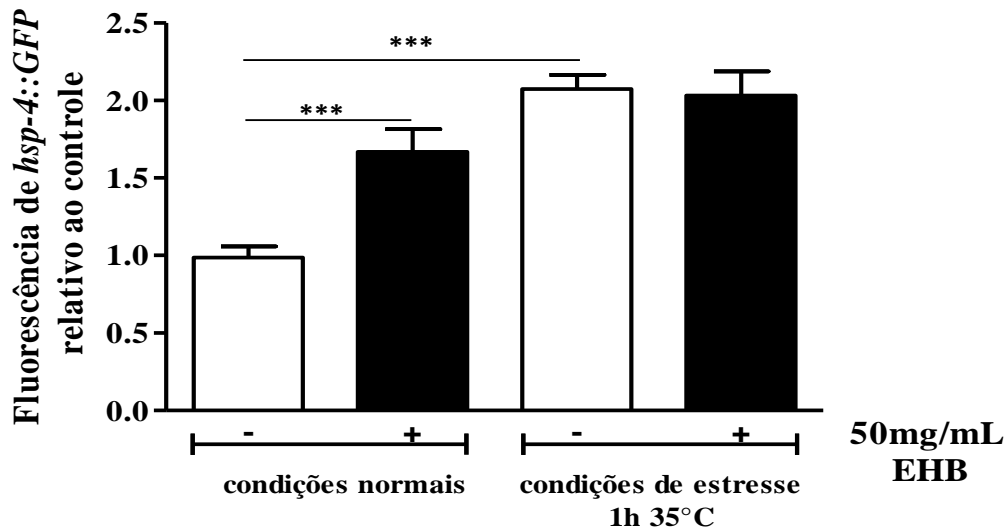
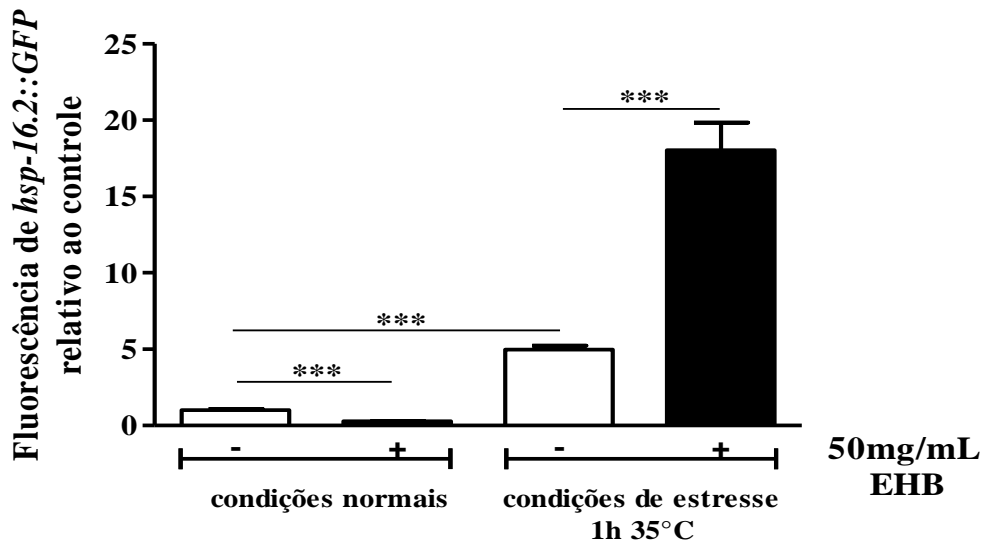
**Figura 12.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na homeostase proteica. O tratamento com 50 mg/mL de EHB aumentou a atividade do proteassoma. Animais tipo selvagem foram tratados ou não com 50 mg/mL de EHB desde L1 até L4. A atividade semelhante à quimiotripsina do proteassoma foi monitorada pela digestão do substrato SLLVY-MCA em extrato proteico de vermes L4 contendo mesma quantidade de proteínas totais. \*\*\* $p < 0.05$  pelo teste t de Student bi-causal.

#### **4.13 Avaliação da Expressão de Proteínas de Choque Térmico**

Sabe-se que o aumento da expressão dos níveis de proteínas de choque térmico (HSPs) aumenta a resistência ao estresse e tem um efeito neuroprotetivo no *C. elegans* (WALKER; LITHGOW, 2003). Aqui nós testamos se o tratamento com 50 mg/mL de EHB poderia modular a expressão das proteínas de choque térmico *hsp-16.2* e *hsp-4*. Sob condições normais, o tratamento com EHB reduziu a expressão de *hsp-16.2::GFP* se comparado ao observado aos animais não tratados. Animais sob condições de estresse mostraram um aumento na expressão de *hsp-16.2::GFP* nos animais tratados em relação ao controle (Figura 13A). A expressão de *hsp-4::GFP* foi maior no grupo tratado com EHB se comparado com o grupo controle sob condições normais. Em animais sob condições de estresse, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos tratados e não tratados com EHB (Figura 13B).

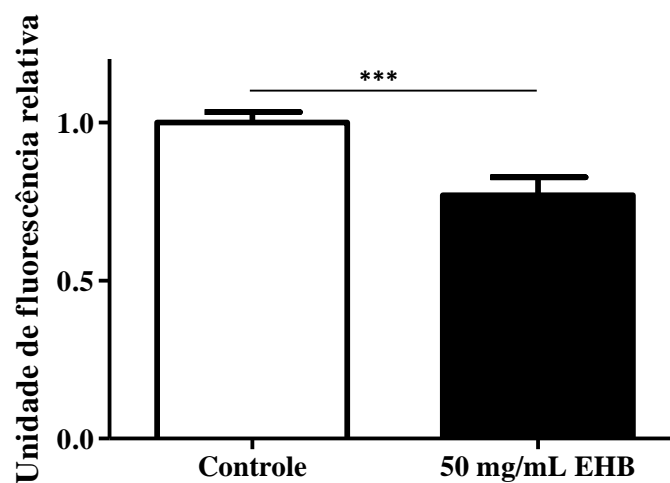
#### **4.14 Quantificação dos Depósitos do Corante Vermelho Nilo nas LROs**

Interessantemente, HSP-4 é uma essencial chaperona do retículo endoplasmático (ER) que detecta o estado nutricional e estimula a expressão de lipases induzíveis. Sua ativação está correlacionada com a redução dos níveis das organelas relacionadas ao lisossoma (LROs) (JO, 2009). LROs são o local de concentração do corante lipofílico vermelho Nilo assim como auto fluorescência associada à idade. Assim, nós investigamos se o tratamento com EHB poderia também levar a redução do corante vermelho Nilo. Nós observamos que os animais tipo selvagem tratados com 50 mg/mL de EHB mostraram menores depósitos do corante fluorescente vermelho Nilo comparado aos animais não tratados (Figura 14).

**A****B**

**Figura 13.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) na expressão de proteínas de choque térmico. Animais transgênicos *hsp-4::GFP* (A) and *hsp-16.2::GFP* (B) foram tratados ou não com 50 mg/mL de EHB por 48 h desde L1 e então transferidos ou não para 35°C por 1 h. Depois de 1h e 30 min de recuperação fotos foram retiradas por um microscópio fluorescente e os sinais de GFP foram quantificados usando o software NIH Image J software. A) A expressão de *hsp-4::GFP* aumentou no grupo tratado com 50 mg/mL de EHB sob condições normais. B) O tratamento com EHB aumentou a expressão de *hsp-16.2* sob condições de estresse. \*\*\* $p < 0.0001$  pelo Kruskal-Wallis teste seguido pelo pós-teste de Dunn.





**Figura 14.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera* (EHB) no depósito do corante vermelho Nilo. Animais tipo selvagem tratados ou não com 50 mg/mL de EHB por 48 h desde L1 foram mantidos em placas contendo vermelho Nilo. Fotografias foram obtidas por um microscópio fluorescente e os sinais de fluorescência GFP foram quantificados usando o software NIH Image J. O tratamento com EHB reduziu o depósito de lipídeos. \*\*\* $p < 0.0001$  pelo Mann-Whitney teste.

## 5 DISCUSSÃO

*B. trimera* tem sido largamente estudada pelas suas propriedades antiinflamatória, antidiabética, analgésica, antihepatotóxica e antimutagênica (OLIVEIRA *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2011; PAUL *et al.*, 2009; GENÉ *et al.*, 1996; TROJAN-RODRIGUES *et al.*, 2012; SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987; RODRIGUES *et al.*, 2009). Embora contenha os polifenóis quercetina e rutina e ácidos fenólicos como os ácidos cafeoilquínicos, não existem estudos descrevendo o uso da *B. trimera* contra disordens neurodegenerativas. Aqui nós mostramos pela primeira vez, usando ensaios *in vivo*, que o tratamento com EHB não somente aumentou a resistência ao estresse oxidativo pelo aumento da taxa de sobrevivência e redução dos níveis de ROS sob condições de estresse oxidativo, mas o EHB aumentou também a defesa contra a toxicidade do peptídeo A $\beta$  no *C. elegans*.

Nossos resultados mostram que o EHB possui propriedades antioxidantes *in vitro* (Tabela 1) e *in vivo* (Figuras 4 e 6), que foram avaliados através do ensaio de atividade contra o radical DPPH e ensaios de resistência ao estresse. O EHB na concentração de 0.5 mg/mL mostrou um baixo percentual de inibição do radical DPPH (19.95%). Já nas concentrações de 5 e 50 mg/mL de EHB foram encontradas maiores atividades antioxidantes (74.27% e 82.86%, respectivamente). Nós também observamos que o metabolismo da bactéria interfere com a capacidade antioxidante do EHB na concentração de 0.5 mg/mL mas não nas concentrações 5 e 50 mg/mL (Tabela 1). No entanto, somente o tratamento com 50 mg/mL de EHB foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência dos animais sob condição de estresse (Figura 4). Grunz *et al* (2012) mostraram por análises químicas e fluorescentes que flavonóides, tais como a quercetina, são ingeridos pelo *C. elegans* e metabolizados através de conjugação de maneira dose-dependente. Isto pode explicar o fato de o tratamento com doses menores (0.5 e 5 mg/mL) não terem sido capazes de aumentar a resistência ao estresse oxidativo (Figura 4 e Tabela 3).

É bem descrito na literatura que a bactéria utilizada como fonte alimentar para o *C. elegans* pode ser patogênica e, portanto, pode alterar o tempo de vida dos animais e a resposta ao estresse oxidativo (PORTAL-CELHAY; BRADLEY; BLASER, 2012; GARIGAN *et al.*, 2002; GEMS; RIDDLE, 2000). De fato tem sido sugerido que nematodos podem ter benefícios na saúde se o alimento for composto de bactéria em

conjunto com substâncias antimicrobianas (PIETSCH *et al.*, 2011). No presente estudo, nós observamos que o tratamento com 50 mg/mL de EHB aumentou a taxa de sobrevivência do *C. elegans* sob condições de estresse mesmo quando a bactéria foi tratada com o antibiótico kan, indicando que a alta taxa de sobrevivência não foi causada somente pelo efeito bacteriostático do EHB (Figuras 5 e 6). Efeito antimicrobiano também foi observado por outros autores que trabalharam com polifenóis isolados ou o extrato de açaí sem comprometer as propriedades benéficas destes compostos no *C. elegans*. Bonomo *et al.* (2014) mostraram que animais tratados com extrato aquoso de açaí (AAE) tiveram uma maior resistência ao estresse oxidativo; o extrato também diminuiu o crescimento bacteriano, porém quando o ensaio de resistência ao estresse foi realizado em animais tratados com AAE e bactéria morta os animais ainda apresentaram um aumento da sobrevivência sob condições de estresse. Em outro estudo, a longevidade do *C. elegans* tratado com quercetina foi analisada tanto na presença de *E.coli* viva quanto morta por choque térmico. A extensão do tempo de vida não foi relacionada ao efeito bacteriano (PIETSCH *et al.*, 2011). Estes resultados suportam fortemente a ideia de que o EHB, por si próprio, possui efeito antioxidante.

Estudos realizados em vários modelos animais têm mostrado uma forte correlação entre resistência ao estresse oxidativo e aumento do tempo de vida, que pode ser explicado pela redução de dano oxidativo em biomoléculas (LITHGOW; WALKER, 2002). Embora o EHB tenha sido capaz de aumentar a resistência ao estresse, nós não observamos aumento no tempo de vida sob condições padrões de laboratório. A ausência de associação entre resistência ao estresse e longevidade também foi reportado em outros estudos mostrando que o efeito antioxidante não é preditivo para o aumento do tempo de vida. Os flavonóides miricetina, quercetina, kaempferol e naringenina aumentaram a longevidade de *C. elegans* tipo selvagem. Porém somente miricetina aumentou o tempo de vida do mutante *mev-1(kn1)*, mutante que possui um tempo de vida menor, sugerindo que a ação antioxidante dos flavonóides sozinha não é suficiente para aumentar a longevidade (GRUNZ *et al.*, 2012). Pun *et al.* (2010) selecionaram 6 extratos de plantas, de um total de 34, baseado na capacidade antioxidante *in vitro*. Os seis extratos aumentaram a resistência ao estresse oxidativo no *C. elegans*. Porém, somente um extrato foi capaz de aumentar também a longevidade nos animais (PUN *et al.*, 2010).

Alguns autores utilizam o *C.elegans* para verificar toxicidade de diferentes compostos. O tratamento com selênio diminuiu de maneira dose dependente o tamanho corporal do *C. elegans* além de reduzir significativamente o tamanho da progênie (LI *et al.*, 2014). Qiao *et al.* (2014) utilizaram o *C. elegans* para verificar a toxicidade de *Genkwa Flos* (GF), utilizada na medicina popular chinesa. Exposição ao GF não somente diminuiu o tamanho corporal como a reprodução, principalmente no primeiro dia de adulto (QUIAO *et al.*, 2014). Assim, podemos sugerir que, pelo fato do EHB não aumentar a longevidade e não interferir no crescimento e reprodução indica que não foi tóxico para o *C. elegans* (Figuras 3, 7A e 7B).

A produção de ERO foi menor no *C. elegans* tratado com EHB tanto sob condições de estresse quanto normais, sugerindo que os compostos fenólicos presentes no EHB neutralizaram diretamente a produção de ERO (Figura 9). Além disso, nós observamos que o tratamento com EHB reduziu a expressão de SOD-3::GFP sob condições normais (Figura 10A). A capacidade do EHB de eliminar radicais livres provavelmente levou a um menor acúmulo destas espécies nas células, resultando na repressão de SOD-3::GFP. Kampkoter *et al.* (2008) também observaram que o tratamento do *C. elegans* com quercetina reduziu a expressão de SOD-3::GFP (KAMPKÖTTER *et al.*, 2008). Para conter o aumento da produção de ERO sob condições de estresse, as células utilizam a glutathiona (GSH), o maior agente redox celular (LU, 2009; LIAO; YU, 2005; MEISTER; ANDERSON, 1983). O fato que a expressão de *gcs-1::GFP* ( $\gamma$ -glutamylcisteinasintetase), que é a enzima que sintetiza GSH, ter sido menor sob condição de estresse nos animais tratados com EHB indica que o EHB foi capaz de prevenir a necessidade de sintetizar mais glutathiona (Figura 10B). Bonomo *et al.* (2014) também observaram que a exposição ao t-BOOH aumentou a expressão de *gcs-1::GFP* e o tratamento com o Extrato Aquoso de Açaí (AAE) previniu esta ativação (BONOMO *et al.*, 2014).

As enzimas glutathionas S-transferases (GSTs) têm um papel chave na fase 2 de detoxificação tanto para eliminar produtos endógenos formados durante o estresse oxidativo quanto de xenobióticos eletrofílicos (MASELLA, 2005; SHEENAN *et al.*, 2001). As GSTs se ligam as GSH e catalisam a conjugação de GSH com os substratos alvos para facilitar sua excreção das células. Vários autores têm mostrado que a expressão de GST é induzida por estresse oxidativo e fitoquímicos (YU; WEI; LIAO,

2014; HASEGAWA *et al.*, 2008). Nós observamos que 50 mg/mL de EHB, mas não 5 mg/mL de EHB, aumentou significativamente a expressão de *gst-4::GFP* sob condições normais (Figura 10C). Nossos resultados sugerem que o EHB pode ser um xenobiótico e, portanto, ele possa funcionar como um médio estressor.

Observando nossos dados da análise de inibição do radical DPPH, ensaios de estresse oxidativo e expressão de *gst-4::GFP*, nós hipotetizamos que a capacidade antioxidante do EHB é contrabalçada por sua propriedade xenobiótica e o metabolismo da bactéria tem um papel nisto. Primeiro a porcentagem de inibição do DPPH da concentração 0.5 mg/mL de EHB foi reduzida de 19.95% para 7.17% quando o extrato foi misturado com bactéria *E. coli*. O tratamento da bactéria com o antibiótico Kan restaurou a capacidade do EHB 0.5 mg/mL inibir o DPPH para 20.82% (Tabela 1). Esta redução pode explicar porque a resistência ao estresse oxidativo dos animais tratados com 0.5 mg/mL de EHB foi menor em relação ao controle (Figura 4 e Tabela 3), mas não é alterada quando o EHB foi misturado com bactéria tratada com Kan (Figura 6 e Tabela 4). A porcentagem de inibição do radical DPPH para as concentrações de 5 e 50 mg/mL de EHB (74.27% e 82.86% respectivamente) não foi alterada quando os extratos foram misturados com bactéria viva (71.38% e 85.35%, respectivamente) ou com bactéria tratada com Kan (73.43% e 87.57%, respectivamente). Sabendo que a quantidade de bactéria adicionada às diferentes concentrações do extrato foi a mesma (OD600 = 1), estes resultados indicam que o metabolismo da bactéria interferiu com a capacidade antioxidante do EHB na concentração mais baixa (0.5 mg/mL), mas não nas maiores (5 e 50 mg/mL). Baseado na expressão de *gst-4::GFP*, nossos resultados indicam que 50 mg/mL de EHB pode ser xenobiótico, mas não 5 mg/mL (Figura 10C). Além disso, a taxa de sobrevivência dos animais alimentados com 5 mg/mL de EHB não foi significativamente diferente do grupo controle (Figura 4 e Tabela 3), mas foi significativamente menor que os controles quando os animais receberam 5 mg/mL de EHB misturado com bactéria tratada com Kan (Figura 6 e Tabela 4). Estes resultados sugerem que o metabolismo da bactéria pode reduzir a capacidade xenobiótica de 5 mg/mL de EHB sem alterar o conteúdo antioxidante. Finalmente, é possível que o efeito antioxidante de 50 mg/mL de EHB supera algum efeito potencial xenobiótico que pode ser observado com baixas doses de EHB (5 mg/mL), mas não com a menor dose testada (0.5 mg/mL). Se isso é verdade, nós esperamos que alguma dose entre 5 mg/mL e 50

mg/mL, o EHB poderia mudar de xenobiótico para antioxidante. Estudos futuros devem ser realizados para esclarecer esta interessante hipótese.

Sabe-se que os antioxidantes da dieta podem agir diretamente através da neutralização de radicais livres, ou indiretamente através da modulação de diferentes vias de sinalização de resposta ao estresse (BONOMO *et al.*, 2014, KAMPKÖTER *et al.*, 2007). A via de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK) é conservada nos animais eucariotos (TULLET *et al.*, 2008, INOUE *et al.*, 2005; AN; BLACKWELL, 2003). Esta via traduz sinais em resposta a uma variedade de estímulos extracelular, como estresse oxidativo e térmico e exposição a drogas e metais pesados (HASEGAWA *et al.*, 2008; ONKEN; DRISCOLL, 2010, KAMPKOTER *et al.*, 2007b). No presente trabalho, nós testamos individualmente pelo menos um mutante para cada subgrupo das três MAPKs que têm sido identificadas: ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), e p38 MAPK (CHANG; KARIN, 2001; KYRIAKIS; AVRUCH, 2001). Nós também testamos individualmente dois mutantes para dois fatores de transcrição (SKN-1 e DAF-16) e um duplo knockdown *skn-1(RNAi);daf-16(RNAi)* que são alvos das vias das MAPKs. SKN-1/Nrf é ativada pelas vias da p38 e ERK MAPK em resposta ao estresse oxidativo ou a xenobióticos (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2006; AN; BLACKWEEL, 2003). DAF-16/FOXO também é alvo da via ERK e JNK-1 MAPK (OKUYAMA *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2005). Estudos têm mostrado o potencial dos antioxidantes para ativar SKN-1 e DAF-16 no *C. elegans*, sugerindo que estes fatores de transcrição são mediadores das respostas benéficas induzidas pelos antioxidantes, como aumento da resistência ao estresse oxidativo e da longevidade. Yaguchi *et al.* (2014) trataram *C. elegans* com sesamina, a mais abundante entre as ligninas. Eles observaram que a taxa de sobrevivência dos animais tratados foi maior tanto sob condições normais quanto sob condições de estresse oxidativo induzido pelo paraquat e peróxido de hidrogênio. Sesamina não foi capaz de prolongar a longevidade dos mutantes *pmk-1*, *skn-1*, *daf-2* e *daf-16*, que codificam os ortólogos em mamíferos da p38, de Nrf, do receptor da insulina/IGF-1, e de FoxO, respectivamente. Estes resultados sugerem a importância da via da p38 MAPK e da via da IIS para mediar o efeito pró-longevidade da sesamina (YAGUCHI *et al.*, 2014).

Considerando que o aumento da resistência ao estresse induzida pelo EHB ainda pode ser observada nos mutantes testados tanto alimentados com *E. coli* ou *E. coli* tratada com Kan, nossos resultados sugerem que nenhuma das vias avaliadas está envolvida com o efeito benéfico do EHB (Tabela 5). Além disso, o aumento da resistência ao estresse induzida pelo EHB ainda foi observada nos animais submetidos ao duplo knockdown de SKN-1 e DAF-16 simultaneamente (Tabela 5). Estes resultados suportam ainda mais que o EHB possui um mecanismo direto de ação.

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela formação de placas compostas principalmente pelo peptídeo insolúvel A $\beta$ . A natureza tóxica do A $\beta$ 1–42 torna-o um marcador da progressão da DA e um alvo para novos tratamentos terapêuticos. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de compostos fenólicos pode reduzir o risco do desenvolvimento da DA (POCERNICH; BUTTERFIELD, 2012). Muitos compostos fenólicos como os derivados do ácido quínico e os polifenóis como o flavonóide quercetina foram identificados em extratos de *B. trimera* de diferentes polaridades (SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005; ABOY *et al.*, 2012). Interessantemente, vários estudos têm mostrado que o efeito protetor dos compostos fenólicos, incluindo a quercetina e os ácidos cafeoilquínicos, contra a neurotoxicidade induzida pelo amilóide é próprio das suas propriedades antioxidantes e em reduzir a formação de espécies A $\beta$  tóxicas (CHOI *et al.*, 2014; REGITZ; DUßLING; WENZEL, 2014). A quercetina diminuiu de maneira dose dependente os agregados protéicos e a paralisia no *C. elegans* transgênico CL2006. Além disso, aumentou a atividade do proteossoma e o fluxo de proteínas através da via macroautofágica demonstrado pela redução da coloração do lisossoma (REGITZ; DUßLING; WENZEL, 2014). Oleuropeína aglicona (OLE), o mais abundante polifenol no óleo de oliva extra virgem, apresentou efeitos benéficos em linhagens transgênicas de *C. elegans* CL2006 e CL4176. OLE reduziu o depósito de placas A $\beta$ , diminuiu os oligômeros A $\beta$  tóxicos, diminuiu a paralisia e aumentou o tempo de vida de animais CL2006. O efeito protetor também foi observado em vermes CL4176, mas somente quando o OLE foi administrado antes da indução da paralisia (DIOMEDE *et al.*, 2013). Martorell *et al.* (2013) mostraram que um peptídeo bioativo obtido do cacau apresentou alta atividade antioxidante em animais tipo selvagem, reduziu a paralisia e o depósito do A $\beta$  na linhagem transgênica de *C. elegans* CL4176 (MARTORELL *et al.*, 2013).

Estes estudos corroboram com nossos achados em que o EHB alivia a paralisia induzida pelo  $\beta$ -amilóide no *C. elegans* (Figura 11A e 11B). Portanto, este resultado poderia ser explicado pela ação antioxidante do EHB.

O aumento da atividade do proteassoma e ativação das chaperonas são respostas altamente conservadas empregadas pelas células eucarióticas para manter a homeostase das proteínas envelhecidas (proteostase) (VOISINE; PEDERSEN; MORIMOTO, 2010; PRAHLAD; MORIMOTO, 2008). Uma falha destes mecanismos em responder adequadamente ao desequilíbrio proteotóxico resulta no acúmulo de proteínas deformadas, que pode levar a doenças neurodegenerativas como o Alzheimer. Para investigar se o EHB poderia estar envolvido na homeostase proteica, nós avaliamos a atividade do proteassoma e a expressão de genes das chaperonas *hsp-16.2* e *hsp-4*. Em *C. elegans*, HSP-4, uma chaperona do retículo endoplasmático (RE), tem um papel central na resposta ao estresse associado com proteínas de choque térmico e proteínas deformadas (KAPULKIN; HIESTER; LINK, 2005). Tem sido mostrado que HSP-16.2 previne que as proteínas deformadas se agreguem e interajam com o peptídeo intracelular humano A $\beta$ 1-42 (FONTE *et al.*, 2008; FONTE *et al.*, 2002). Nós observamos que o tratamento com 50 mg/mL de EHB aumentou a atividade de degradação do proteassoma (Figura 12) e a expressão de *hsp-4::GFP* sob condições normais (Figura 13A). Além disso, nós observamos que o EHB aumentou a expressão de *hsp-16.2::GFP* sob condições de estresse (Figura 13B). Estes resultados sugerem que o EHB aliviou a toxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide, em parte, pelo aumento da atividade do proteassoma e expressão gênica de duas proteínas de choque térmico.

HSP-4 também estimula a expressão de lipases induzidas pelo jejum, que reduz a fluorescência do corante vermelho Nilo nas LROs após o jejum no *C. elegans* (JO *et al.*, 2009). A observação que o tratamento com EHB aumentou a expressão de *hsp-4* levou-nos a perguntar se o tratamento com EHB poderia reduzir o acúmulo do vermelho Nilo nas LROs. Nós observamos que o nível da coloração das LROs pelo vermelho Nilo foi reduzido quando comparado aos animais não tratados (Figura 14). Em *C. elegans*, as LROs, como os lisossomos, desempenham um papel chave no tráfego de proteínas e produtos de degradação ao redor da célula (SOUKAS; CARR; RUVKUN, 2013). Elas são também os locais de auto fluorescência microscópica que se acumula nos animais mais velhos (SOUKAS; CARR; RUVKUN, 2013; GERSTBREIN *et al.*, 2005).



Portanto, uma diminuição do vermelho Nilo pode servir como um indicador do aumento da resistência ao estresse e tempo de vida, desde que a fluorescência é menor nos mutantes de vida longa (e.g., *daf-2*) comparado aos mutantes de vida curta (e.g., *daf-16*) (O'ROURKE *et al.*, 2009). Nossos resultados estão de acordo com esta hipótese, desde que o EHB aumentou a resistência ao estresse (Figura 4). Finalmente, nossos resultados sugerem que o possível efeito neuroprotetor do EHB contra o peptídeo A $\beta$ 1-42 é também um resultado de um aumento da homeostase proteica.

## 6 CONCLUSÃO

Nossos dados revelam que o EHB aumenta a resposta ao estresse oxidativo no *C. elegans*, que está de acordo com achados prévios *in vitro*. Nossos resultados também sugerem um potencial uso neuroprotetor da *B. trimera*, suportando a ideia que antioxidantes da dieta têm uma abordagem promissora para impulsionar sistemas de defesa contra o estresse e neurodegeneração. A caracterização do EHB aqui testado poderia fornecer informações adicionais dos compostos presentes no extrato e poderia levar-nos a um melhor entendimento de como este poderoso fitoquímico age e como seu uso poderia melhorar a saúde humana. Também seria interessante verificar se o EHB, além de melhorar a paralisia no modelo de *C. elegans* para DA, também poderia ser capaz de diminuir o depósito do peptídeo A $\beta$ .

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOY, A.L.; APEL, M.A.; DEBENEDETTI, S. *et al.* Assay of Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 1219, p. 147-153, 2012.

ADACHI, H.; ISHII, N. Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in *C. elegans*. **Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 55, p. B280-B285, 2000.

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

ALEXANDER, A.G.; MARFIL, V.; LI, C. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 2014.

AN, J.H.; VRANAS, K.; LUCKE, M. *et al.* Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 45, p. 16275-16280, 2005.

AN, J.H.; BLACKWELL, T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes Development**, v. 17, n. 15, p. 1882-1893, 2003.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ANSARI, M.A.; ABDUL, H.M.; JOSHI, G.; OPII, W.O.; BUTTERFIELD, D.A. Protective effect of quercetin in primary neurons against A $\beta$ (1-42): relevance to Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 269-275, 2009.

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

AYYADEVARA, S.; BALASUBRAMANIAM, M.; GAO, Y. *et al.* Proteins in aggregates functionally impact multiple neurodegenerative disease models by forming proteasome-blocking complexes. **Aging Cell**, p. 1-14, 2014.

BARCELOS, G.R.; GROTTTO, D.; SERPELONI, J.M. *et al.* Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 1151-1157, 2011.

BARGMANN, C.I.; MORI, I. Chemotaxis and Thermotaxis. In: Riddle DL et al., editors. *C. elegans* II. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. No abstract available. Chapter 25, 1997.

BASS, T.M.; WEINKOVE, D.; HOUTHOOFD, K. *et al.* Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *C. elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 546-552, 2007.

BENSASSON, R.V.; ZOETE V.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; TALALAY, P. Two-step mechanism of induction of the gene expression of a prototypic cancer-protective enzyme by diphenols. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 805-812, 2008.

BIONDO, T.M.; TANAE, M.M.; COLETTA, E.D. *et al.* Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 368-373, 2011.

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

BLACKWELL, T.K.; BOWERMAN, B.; PRIESS, J.R.; WEINTRAUB, H. Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP and homeodomain elements. **Science**, v. 266, p. 621-628, 1994.

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

BONA, C.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Propagation of three species of *Baccharis* by cuttings. **Revista Ciência Rural**, v. 35, p. 223-226, 2005.

BONOMO, L.F.; SILVA, D.N.; BOASQUIVIS, P.F. *et al.*, Açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Direct and Indirect Mechanisms. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e89933, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

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

CABREIRO, F.; ACKERMAN, D.; DOONAN, R. *et al.* Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by

decreased oxidative damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 8, p. 1575-82, 2011.

CALABRESE, V.; CORNELIUS, C.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T. *et al.* Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 753-783, 2012.

CALABRESE, V.; CORNELIUS, C.; MANCUSO, C. *et al.* Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 12, p. 2444-2471, 2008.

CASTRO, L.; FREEMAN, B.A. Reactive oxygen species in human health and disease. **Nutrition**, v. 17, n. 2, p. 161-165, 2001.

*C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, p. 2012-2018, 1988.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 37-40, 2001.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 271-281, 2014.

CHEN, C.M. Tert-Butyl hydroperoxide: An Overview. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 77:222, p. 1-9, 2005.

CHEN, N.; HARRIS, T.W.; ANTOSHECHKIN, I. *et al.* WormBase: a comprehensive data resource for *Caenorhabditis* biology and genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 383-389, 2005.

CHENG, P1.; ALBERTS, I.; LI, X. The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 783-789, 2013.

CHOE, K.P.; PRZYBYSZ, A.J.; STRANGE, K. The WD40 repeat protein WDR-23 functions with the CUL4/DDB1 ubiquitin ligase to regulate nuclear abundance and activity of SKN-1 in *C. elegans*. **Molecular Cell Biology**, v.29, p. 2704-2715, 2009.

CHOI, S.J.; KIM, J.K.; SUH, S.H. *et al.*, *Ligularia fischeri* Extract Protects Against Oxidative-Stress-Induced Neurotoxicity in Mice and PC12 Cells. **Journal of Medicinal Food**, 2014.

COIMBRA, R. Notas de fitoterapia. **Catálogos dos dados principais sobre plantas utilizadas em medicina e farmácia**, Araújo, C.S. Ed., 1st ed., p. 222, 1942.

COLLINSON, E.J.; WIMMER-KLEIKAMP, S.; GEREGA, S.K. *et al.* The yeast homolog of heme oxygenase-1 affords cellular antioxidant protection via the

transcriptional regulation of known antioxidant genes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 3, p. 205-214, 2011.

COOKE, M.S.; EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. **Faseb Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.

CZYEWSKI, E.; BARBISAN, E.M.; ROSA, R.L.D. *et al.* Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de *B. trimera* (*Baccharis trimera*) e *Vassoura* (*Baccharis dracunculifolia*). **XVI Encontro de Química da Região Sul**. FURB, 13 a 15 de novembro de 2008.

DAS, B.N.; KIM Y.W.; KEUM, Y.S. Mechanisms of Nrf2/Keap1-Dependent Phase II Cytoprotective and Detoxifying Gene Expression and Potential Cellular Targets of Chemopreventive Isothiocyanates. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2013, article ID 839409, 7 pages, 2013.

de ROOS, B.; DUTHIE, G.G. Role of dietary pro-oxidants in the maintenance of health and resilience to oxidative stress. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2014.

DIAS, L.F.T.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E.M. Antiulcerogenic and antioxidant activities of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 309-314, 2009.

DINKOVA-KOSTOSA, A.T.; HOLTZCLAW, W.D.; COLE, R.N. *et al.* Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proceedings of National Academy of science**, v. 99, p. 11908-11913, 2002.

DINKOVA-KOSTOSA, A.T.; LIBY, K.T.; STEPHENSON, K.K. *et al.* Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of preprotection against oxidant and inflammatory stress. **Proceedings of National Academy of science**, v. 102, p. 4584-4589, 2005.

DIOMEDE, L.; RIGACCI, S.; ROMEO, M.; STEFANI, M.; SALMONA, M. Oleuropein aglycone protects transgenic *C. elegans* strains expressing A $\beta$ 2 by reducing plaque load and motor deficit. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58893, 2013.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

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

EVASON, K.; HUANG, C.; YAMBEN, I. *et al.* Anticonvulsant medications extend worm life-span. **Science**, v. 307, p. 258-262, 2005.

EVASON, K.; COLLINS, J.J.; HUANG, C. *et al.* Valproic acid extends *C. elegans* lifespan. **Aging Cell**, v.7, p. 305-317, 2008.

FAHEY, J.W.; HARISTOY, X.; DOLAN, P.M. *et al.* Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. **Proceedings of National Academy of science**, v. 99, n. 11, p. 7610-7615, 2002.

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

FITZGERALD, V.; MENSACK, M.; WOLFE, P.; THOMPSON, H. A transfer-less, multi-well liquid culture feeding system for screening small molecules that affect the longevity of *C. elegans*. **Biotechniques**, v. 47, p. ix-xv, 2009.

FONTE, V.; KIPP, D.R.; YERG, J. *et al.* Suppression of in vivo beta-amyloid peptide toxicity by overexpression of the HSP-16.2 small chaperone protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 2, p. 784-791, 2008.

FONTE, V.; KAPULKIN, W.J.; TAFT, A. *et al.* Interaction of intracellular beta amyloid peptide with chaperone proteins. **PNAS**, v. 99, n. 14, p. 9439-9444, 2002.

FU, X.L.; GAO, D.S. Endoplasmic reticulum proteins quality control and the unfolded protein response: The regulative mechanism of organisms against stress injuries. **Biofactors**, v. 40, n. 6, p. 569-585, 2014.

GAMBERINI, M.T.; SKORUPA, L.A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86 (Suppl. II), p. 137-139, 1991.

GARIGAN, D.; HSU, A.L.; FRASER, A.G. *et al.*, Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. **Genetics**, v. 161, n. 3, p. 1101-1112, 2002.

GENÉ, R.M.; CARTAÑA, C.; ADZET, T. *et al.*, Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Medica**, v. 62, n. 3, p. 232-235, 1996.

GEMS, D.; RIDDLE, D.L. Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 154, n. 4, p. 1597-1610, 2000.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M.J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 53, p. 1370-1373, 2005.

GERSTBREIN, B.; STAMATAS, G.; KOLLIAS, N.; DRISCOLL M. In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v. 4, n. 3, p. 127-137, 2005.

GIPP, J.J.; BAILEY, H.H.; MULCAHY, R.T. Cloning and sequencing of the cDNA for light subunit of human liver gamma-glutamylcysteine syntase and relative mRNA levels

for heavy and light subunits in human normal tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, p. 584-589, 1995.

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

GORBATYUK, M.S.; GORBATYUK, O.S. The Molecular Chaperone GRP78/BiP as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders: A Mini Review. **Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy**, v. 4, n. 2, p. 128, 2013.

GRANCE, S.R.M.; TEIXEIRA, M.A.; LEITE, R.S. *et al.* Baccharis trimera: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 28-33, 2008.

GRAY, N.E.; MORRÉ, J.; KELLEY, J. *et al.*, Caffeoylquinic acids in Centella asiatica protect against  $\beta$ -amyloid toxicity. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 40, n. 2, p. 359-373, 2014.

GRUNZ, G.; HAAS, K.; SOUKUP, S. *et al.* Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. **Mechanisms Ageing and Development**, v. 133, n. 1, p. 1-10, 2012.

GUTZEIT, H.O.; HENKER, Y.; KIND, B.; FRANZ, A. Specific interactions of quercetin and other flavonoids with target proteins are revealed by elicited fluorescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, p. 490-495, 2004.

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

HARTL, F.U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, p. 324-332, 2011.

HASEGAWA, K.; MIWA, J. Genetic and cellular characterization of *C. elegans* mutants abnormal in the regulation of many phase II enzymes. **PLoS One**, v. 5, p. e11194, 2010.

HASEGAWA, K.; MIWA, S.; TSUTSUMIUCHI, K.; MIWA, J. Allyl isothiocyanate that induces GST and UGT expression confers oxidative stress resistance on *C. elegans*, as demonstrated by nematode biosensor. **PLoS One**, v. 5, p. e9267, 2010.

HASEGAWA, K.; MIWA, S.; TAJIMA, T. *et al.* A rapid and inexpensive method to screen for common foods that reduce the action of acrylamide, a harmful substance in food. **Toxicology Letters**, v. 175, n.1-3, p. 82-88, 2007.

HASEGAWA, K.; MIWA, S.; ISOMURA, K. *et al.* Acrylamide-responsive genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology Science**, v. 101, n. 2, p. 215-225, 2008.



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

HO, L.; FERRUZZI, M.G.; JANLE, E.M. *et al.* Identification of brain-targeted bioactive dietary quercetin-3-O-glucuronide as a novel intervention for Alzheimer's disease. **FASEB Journal**, v.27, n. 2, p. 769-781, 2013.

HU, R.; XU, C.; SHEN, G. *et al.* Identification of Nrf2-regulated by chemopreventive isothiocyanate PEITC by oligonucleotide microarray. **Life Science**, v. 79, p. 1944-1955, 2006.

HUNG, T.M.; NA, M.; THUONG, P.T. *et al.* Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 188-192, 2006.

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

IWASAWA, H.; MORITA, E.; YUI, S.; YAMAZAKI, M. Anti-oxidant Effects of Kiwi Fruit in Vitro and in Vivo. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 128-134, 2011.

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

JEONG, C.H.; JEONG, H.R.; CHOI, G.N. *et al.* Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. **Chinese Medicine**, v. 6, n. 25, 2011.

JO, H.; SHIM, J.; LEE, J.H.; LEE, J.; KIM, J.B. IRE-1 and HSP-4 contribute to energy homeostasis via fasting-induced lipases in *C. elegans*. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 5, p. 440-448, 2009.

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

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

KALETTA, T.; HENGARTNER, M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews*. **Drug Discovery**, v. 5, p. 387-398, 2006.

KAMPKÖTTER, A.; PIELARSKI, T.; ROHRIG, R. *et al.* The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and

glutathione S-transferase 4 in *C. elegans*. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 139-147, 2007.

KAMPKÖTTER, A.; NKWONKAM, C.G.; ZURAWSKI, R.F. *et al.*, Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 12, p. 849-858, 2007b.

KAMPKÖTTER, A.; TIMPEL, C.; ZURAWSKI, R.F. *et al.* Increase of stress resistance and lifespan of *caenorhabditis elegans* by quercetin. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 149, n. 2, p. 314-323, 2008.

KAPULKIN, W.J.; HIESTER, B.G.; LINK, C.D. Compensatory regulation among ER chaperones in *C. elegans*. **FEBS Letters**, v. 579, n. 14, p. 3063-3068, 2005.

KEUM, Y.S. Regulation of Nrf2-Mediated Phase II Detoxification and Anti-oxidant Genes. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 144-151, 2012.

KIM, D.H. Bacteria and the aging and longevity of *Caenorhabditis elegans*. **Annual Review of Genetics**, v. 47, p. 233-246, 2013.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 46, p. 113-140, 2006.

KÖNCZÖL, A.; BÉNI, Z.; SIPOS, M.M. *et al.* Antioxidant activity-guided phytochemical investigation of *Artemisia gmelinii* Webb. ex Stechm.: isolation and spectroscopic challenges of 3,5-O-dicaffeoyl (epi?) quinic acid and its ethyl ester. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, p. 83-89, 2012.

KUMAR, J. Silymarin Extends Lifespan and Reduces Proteotoxicity in *C.elegans* Alzheimer's Model. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, 2015.

KWEON, M.H.; IN PARK, Y.; SUNG, H.C.; MUKHTAR, H. The novel antioxidant 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid induces Nrf2-dependent phase II detoxifying genes and alters intracellular glutathione redox. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 8, p. 1349-1361, 2006.

KYRIAKIS, J.M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 807-869, 2001.

LANDIS, J.N.; MURPHY, C.T. Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 5, p. 1405-1412, 2010.

LI, W.H.; JU, Y.R.; LIAO, C.M.; LIAO, V.H. Assessment of selenium toxicity on the life cycle of *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 7, p. 1245-1253, 2014

- LIAO, V.H.; YU, C.W. *Caenorhabditis elegans* gcs-1 confers resistance to arsenic-induced oxidative stress. **Biometals**, v. 18, n. 5, p. 519-528, 2005.
- LITHGOW, G.J.; WHITE, T.M.; MELOV, S.; JOHNSON, T.E. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 92, n. 16, p. 7540-4, 1995.
- LITHGOW, G.J.; WALKER, G.A., Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, n. 7, p. 765-771, 2002.
- LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S.H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutrition Research**, v. 21, p. 295-307, 2004.
- LOSQUI, Y.R.; ROZETEI, F.S.S.; ALMEIDA, M.B. *et al.* Activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae on culture of retinal ganglion cells *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 931-936, 2009.
- LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. **Current Topics inn Cellular regulation**, v. 36, p. 95-116, 2000.
- LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1-2, p. 42-59, 2009.
- MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 125, p. 376–393, 2010.
- MASELLA, R. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586, 2005.
- MARTORELL, P.; BATALLER E.; LLOPIS, S. *et al.* A Cocoa Peptide Protects *Caenorhabditis elegans* from Oxidative Stress and  $\beta$ -Amyloid Peptide Toxicity. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63283, 2013.
- McCORD, J.M. Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 2, p. 307-310, 1986.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.
- MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G. *et al.* Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 651-657, 2012.
- MOSKAUG, J.Ø.; CARLSEN, H.; MYHRSTAD, M.; BLOMHOFF, R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 315-324, 2004.

MULCAHY, R.T.; WARTMAN, M.A.; BAILEY, H.H.; GIPP, J.J. Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 11, p. 7445-7454, 1997.

MURAKAMI, A. Modulation of protein quality control systems by food phytochemicals. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 215-227, 2013.

MURPHY, C.T. The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: Approaches and discoveries. **Experimental Gerontology**, v.41, n.10, p. 910-921, 2006.

MURPHY, C.T.; McCARROL, S.A.; BARGMANN, C.I. *et al.* Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277-283, 2003.

NABAVI, S.F.; NABAVI, S.; MIRZAEI, M.; MOGHADDAM, A.H. Protective effect of quercetin against sodium fluoride induced oxidative stress in rat's heart. **Food & Function**, v. 3, p. 437-431, 2012.

NICOD, N.; CHIVA-BLANCH, G.; GIORDANO, E. *et al.* Green tea, cocoa, and red wine polyphenols moderately modulate intestinal inflammation and do not increase high-density lipoprotein (HDL) production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 10, p. 2228-2232, 2014.

NHO, R.S.; HERGERT, P. FoxO3a and disease progression. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 346-354, 2014.

NOGUEIRA, N.P.; REIS, P.A.; LARANJA, G.A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. **Journal of ethnopharmacology**, v 118, p. 513-522, 2011.

OGAH, O.; WATKINS, C. S.; UBI, B.E.; ORAGUZIE, N. C. Phenolic Compounds in Rosaceae Fruit and Nut Crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9369-9386, 2014.

OKUYAMA, T.; INOUE, H.; OOKUMA, S. *et al.* The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and insulin-like signaling in *C. elegans*. **Journal Biological Chemistry**, v. 285, p. 30274-30281, 2010.

OLIVEIRA, A.C.P.; ENDRINGER, D.C.; AMORIM, L.A.S; BRANDÃO, M.G.L.; COELHO, M.M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 465-469, 2005.

OH, S.W.; MUKHOPADHYAY, A.; SVRZIKAPA, N. *et al.* Jnk regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/daf-16. **PNAS**, v. 102, n. 12, p. 4494-4499, 2005.

OLIVEIRA, R.N.; REHDER, V.L.; SANTOS OLIVEIRA, A.S. *et al.* *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, vol. 132, p. 135-143, 2012.

OLIVEIRA, R.P. *et al.* SKN-1 and DAF-16 oxidative stress response and prolongs *C. elegans* life span. In: **15th International C. elegans Meeting**, XV, 2007, Los Angeles, 2007.

ONKEN, B.; DRISCOLL, M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. **PLoS. One**, v.5, p. 8758, 2010.

ONO, K.; LI, L.; TAKAMURA, Y. *et al.* Phenolic compounds prevent amyloid  $\beta$ -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 18, p. 14631-14643, 2012.

O'ROURKE, E. J.; SOUKAS, A.A.; CARR, C.E.; RUVKUN, G. *C. elegans* Major Fats Are Stored in Vesicles Distinct from Lysosome-Related Organelles. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 5, p- 430-435, 2009.

OSBURN, W.O.; KENSLER, T.W. Nrf2 signaling: an adaptative response pathway for protection against environmental toxic insults. **Mutation Research**, v. 659, p. 31-39, 2008.

PADUA, Bda.C. ; SILVA, L.D.; ROSSONI JUNIOR, J.V. *et al.* Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 381-386, 2010.

PADUA, Bd.C.; ROSSONI JUNIOR, J.V.; MAGALHAES, C.L.B. *et al.* *Baccharis trimera* improves the antioxidant defense system and inhibits iNOS and NADPH oxidase expression in a rat model of inflammation. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 975-984, 2013.

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

PETRASCHECK, M.; YE, X.; BUCK, L.B. An antidepressant that extends lifespan in adult *C. elegans*. **Nature**, v.450, p. 553-556, 2007.

PIETSCH, K.; SAUL, N.; CHAKRABARTI, S. *et al.* Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. **Biogerontology**, v. 12, n. 4, p. 329-347, 2011.

PIETSCH, K.; SAUL, N.; MENZEL, R. *et al.* Quercetin mediated lifespan extension in *C. elegans* is modulated by *age-1*, *daf-2*, *sek-1* and *unc-43*. **Biogerontology**, v. 10, p. 565-578, 2009.

POCERNICH, C.B.; BUTTERFIELD, D.A. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 5, p. 625-630, 2012.

PORTAL-CELHAY, C.; BRADLEY, E.R.; BLASER, M.J. Control of intestinal bacterial proliferation in regulation of lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 49, 2012.

POWOLNY, A.A.; SINGH, S.V.; MELOV, S.; HUBBARD, A.; FISHER, A.L. The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via *skn-1* activation. **Experimental Gerontology**, v.46, n. 6, p. 441-452, 2011.

PRAHLAD, V.; MORIMOTO, R.I. Integrating the stress response: lessons for neurodegenerative diseases from *C. elegans*. **Cell**, v. 19, n. 2, p. 52-61, 2008.

PUN, P.B.; GRUBER, J.; TANG, S.Y. *et al.*, Ageing in nematodes: do antioxidants extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*? **Biogerontology**, v. 11, n. 1, p. 17-30, 2010.

QIAO, Y.; ZHAO, Y.; WU, Q. *et al.* Full toxicity assessment of Genkwa Flos and the underlying mechanism in nematode *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91825, 2014.

RAMOS-GOMES, M.; KWAK, M.K.; DOLAN, P.M. *et al.* Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzymes inducers is lost in Nrf2 transcription factor-deficient mice. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 98, p. 3410-3415, 2001.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, M.N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

REGITZ, C.; DUBLING, L.M.; WENZEL, U. Amyloid-beta ( $A\beta_{1-42}$ )-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2014.

REINKE, V. Functional exploration of the *C. elegans* genome using DNA microarrays. **Nature Genetics**, v. 32, p. 541-546, 2002.

RIDDLE, D.L.; ALBERT, P.S. (1997) Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development. In: Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR, editors. *C. elegans* II. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 26.

RODRIGUES, C.R.F.; DIAS, J.H.; de MELLO, R.N. *et al.* Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 97–101, 2009.

ROSSI, L.; MAZZITELLI, S.; ARCIELL, M.; CAPO, C.R.; ROTILIO, G. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. **Neurochemical research**, v. 33, n. 12, p. 2390-2400, 2008.

SALAZAR, M.; ROJO, A.I.; VELASCO, D.; de SAGARRA, R.M.; CUADRADO, A. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 21, p. 14841-14851, 2006.

SANGHA, J.S.; SUN, X.; WALLY, O.S. *et al.* Liuwei Dihuang (LWDH), a traditional Chinese medicinal formula, protects against  $\beta$ -amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43990, 2012.

SASAKI, K.; HAN, J.; SHIMOZON, H.; VILLAREAL, M.O.; ISODA, H. Caffeoylquinic acid-rich purple sweet potato extract, with or without anthocyanin, imparts neuroprotection and contributes to the improvement of spatial learning and memory of SAMP8 mouse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 21, p. 5037-5045, 2013.

SARKADI, B.; HOMOLYA, L.; SZAKÁCS, G.; VÁRADI, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 1179-1236, 2006.

SHARONI, Y.; DANILENKO, M.; DUBI, N.; BEN-DOR, A.; LEVY, J. Carotenoids and transcription. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, p. 89-96, 2004.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V.M.; DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 15, p. 1-16, 2001.

SI, H.; LIU, D. Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 6, p. 581-591, 2014.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIMÕES-PIRES, C.A.; QUEIROZ, E.F.; HENRIQUES, A.T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and On-line Identification of Antioxidant Compounds from Three *Baccharis* Species by HPLC-UV-MS/MS with Post-column Derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 307–314, 2005.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

- SOHAL, R.S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, p. 59-63, 1996.
- SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, n. 1, p. 37-39, 1987.
- SON, T.G.; CAMANDOLA, S.; MATTSON, M.P. Hormetic Dietary Phytochemicals. **NeuroMolecular Medicine**, v. 10, p. 236–246, 2008.
- SOUKAS, A.A.; CARR, C.E.; RUVKUN, G. Genetic Regulation of *Caenorhabditis elegans* Lysosome Related Organelle Function. **PLoS ONE**, v. 9, no. 10, p. e1003908, 2013.
- SOUSA, M.P. *et al.* 1991. *B. trimera*. In: De Sousa, M.P. *et al.* (Eds.), **Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras**. UFC, Fortaleza, p. 223-228.
- SPADA, P.D.S.; DANI, C.; BORTOLINI, G.V. *et al.*, Frozen Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) Prevents Hydrogen Peroxide-Induced Damage in the Cerebral Cortex, Cerebellum, and Hippocampus of Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 5, p. 1084-1088, 2009.
- SUGIMOTO, A. High-throughput RNAi in *C. elegans*: genome-wide screens and functional genomics. **Differentiation**, v. 72, p. 81-91, 2004.
- TAGUCHI, K.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes to Cells**, vol. 16, n. 2, p. 123-140, 2011.
- TAMAOKA, A. The pathophysiology of Alzheimer's disease with special reference to "amyloid cascade hypothesis". **Rinsho Byori**, v. 61, n. 11, p. 1060-1069, 2013.
- TORMOS, A.M.; TALÉNS-VISCONTI, R.; NEBREDA, A.R.; SASTRE, J. p38 MAPK: a dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species. **Free Radical Research**, v. 47, n. 11, p. 905-916, 2013.
- TORRES, L.M.; GAMBERINI, M.T.; ROQUE, N.F. *et al.* Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 617-619, 2000.
- TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T.L.; SOARES, G.L.; RITTER, M.R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012.
- TULLET, J.M.; HERTWECK, M.; AN, J.H. *et al.* Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. **Cell Biology**, v. 132, p. 1025-1038, 2008.



VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal Biochemistry Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VERDI, L.G.; BRIGHENT, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.

VERMEULEN, P.B.; GASPARINI, G.; FOX, S.B. *et al.* Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus of the methodology and criteria of evaluation. **European Journal of Cancer**, v. 32A, n. 14, p. 2474-2484, 1996.

VIEIRA, T.O.; SEIFRIZ, I.; CHARÃO, C.C.T. *et al.* Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 601-607, 2011.

VILCHEZ, D.; MORANTTE, I.; LIU, Z. *et al.* RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. **Nature**, v. 489, p. 263-268, 2012.

VOISINE, C.; PEDERSEN, J.S.; MORIMOTO, R.I. Chaperone networks: Tipping the balance in protein folding diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 10, p. 12-20, 2010.

WALKER, A.K.; SEE, R.; BATCHELDER, C. *et al.* A conserved transcription motif suggesting functional parallels between *C. elegans* SKN-1 and Cap'n'Collar-related basic leucine zipper proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 22166-22171, 2000.

WALKER, J.M.; KLAJKOTSKAIA, D.; AJIT, D. *et al.* Beneficial Effects of Dietary EGCG and Voluntary Exercise on Behavior in an Alzheimer's Disease Mouse Model. **Journal of Alzheimers Disease**, 2014.

WALKER, G.A.; LITHGOW, G.J. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals, **Aging Cell**, v. 2, n. 2, p. 131-139, 2003.

WALLE, T. Serial review: flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 829-837, 2004.

WILSON, M.A.; SHUKITT-HALE, B.; KALT, W. *et al.* Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *C. elegans*. **Aging Cell**, v.5, p. 59-68, 2006.

WU, Y.; WU, Z.; BUTKO, P. *et al.* Amyloid- $\beta$ -Induced Pathological Behaviors Are Suppressed by Ginkgo biloba Extract EGb 761 and Ginkgolides in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 50, p. 13102-13113, 2006.

XU, C.; LI, C.Y.; KONG, A.N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 249-268, 2005.

YAGUCHI, Y.; KOMURA, T.; KASHIMA, N. *et al.* Influence of oral supplementation with sesamin on longevity of *Caenorhabditis elegans* and the host defense. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 1659-1668, 2014.

YEN, K.; NARASIMHAN, S.D.; TISSENBAUM, H.A. DAF-16/Forkhead box O transcription factor: many paths to a single Fork(head) in the road. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 14, n. 4, p. 623-34, 2011.

YIN, F.; JIANG, T.; CADENAS, E. Metabolic triad in brain aging: mitochondria, insulin/IGF-1 signalling and JNK signalling. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 1, p. 101-105, 2013.

YOU, Y.J.; KIM, J.; RAIZEN, D.M.; AVERY, L. Insulin, cGMP, and TGF-beta signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: a model for satiety. **Cell Metabolism**, v. 7, p. 249-257, 2008.

YOUDIM, K.A.; JOSEPH, J.A. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunction: a multiplicity effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 6, p. 583-594, 2001.

YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v.62: 763-768, 2007.

YU, Y.B.; DOSANJH, L.; LAO, L. *et al.*, Cinnamomum cassia Bark in Two Herbal Formulas Increases Life Span in *Caenorhabditis elegans* via Insulin Signaling and Stress Response Pathways. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9339, 2010.

YU, C.-W.; WEI, C.-C.; LIAO, V.H.-C. Curcumin-mediated oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, akt-1, pdk-1, osr-1, unc-43, sek-1, skn-1, sir-2.1, and mev-1. **Free Radical Research**, v. 48, n. 3, p. 371-379, 2014.

ZHANG, L.; ZHANG, J.; ZHAO, B.; ZHAO-WILSON, X. Quinic acid could be a potential rejuvenating natural compound by improving survival of *Caenorhabditis elegans* under deleterious conditions. **Rejuvenation Research**, v. 5, n. 6, p. 573-583, 2012.

ZHANG, S.X.; SANDERS, E.; FLIESLER, S.J.; WANG, J.J. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration. **Experimental Eye Research**, v. 125, p. 30-40, 2014.