

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Thaís Prata Terra de Rezende

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE COMPLEXOS
DE FERRO NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO
EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Rio de Janeiro
2012

Thaís Prata Terra de Rezende

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE COMPLEXOS
DE FERRO NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO
EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Projeto Final apresentado ao Instituto de
Química da Universidade Federal do Rio
de Janeiro como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Químico.

Orientadores: Marcos Dias Pereira
Thales de Paula Ribeiro

Rio de Janeiro
2012

Thaís Prata Terra de Rezende

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE COMPLEXOS
DE FERRO NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO
EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Projeto Final apresentado ao Instituto de
Química da Universidade Federal do Rio
de Janeiro como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Químico.

Aprovado em 27 de agosto de 2012 .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Dias Pereira – IQ/UFRJ

Prof. Dra. Elis Cristina Araujo Eleutherio – IQ/UFRJ

Prof. Dra. Marciela Scarpellini – IQ/UFRJ

*Aos meus pais, Rita e Adalberto,
e a todos que acreditaram, me apoiaram
e incentivaram ao longo dessa
caminhada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Ao Prof. Marcos Pereira, pela orientação nesse trabalho, pelo carinho, atenção e contribuição.

Ao Thales Ribeiro, por toda a paciência, compreensão, auxílio e discussões, que, aliás, iam da bioquímica ao português, e mais tantos outros assuntos.

Às Professoras Elis Eleutherio e Marciela Scarpellini por não só participarem da banca examinadora desse projeto, mas também por todo o carinho.

A todos do LIFE, Daiane, Leonardo, Raquel, Verônica, Eduardo, Vinícius, Penélope, Juliana, Aline, Renata, Frederico, Allan, Alex, Daiene e Andreza, que me acolheram com tanto carinho, me ajudaram tanto nesses últimos meses e fizeram da execução desse projeto algo ainda mais prazeroso.

Aos meus pais, que sempre apoiaram minhas decisões, inclusive a de ir para a UFRJ, apesar de ficarem apreensivos pela distância, pelos riscos e por minhas poucas noites de sono.

Ao meu namorado Thiago, por sempre ter estado ao meu lado, por toda compreensão, apoio, proteção e carinho, principalmente na fase de redação desse projeto.

Aos meus amigos Débora, Juliana Azevedo, Juliana Araujo, Renata, Laura, Valquirya, Marcus, Thiago Carvalho, Thiago Wolff e Leonardo, pelas risadas, furadas, viagens e por terem sido muitas vezes minha motivação para mais um dia de faculdade.

À Tatiana Pessanha, pela amizade, carinho, e auxílio, sobretudo pelo auxílio na dosagem de peróxido de hidrogênio.

À UFRJ, por ter me proporcionado tudo isso!

“(...) É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”

Los Hermanos – Além do que se vê

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Geração de espécies reativas de oxigênio durante a redução parcial do oxigênio molecular	5
Figura 2. Estrutura tridimensional da enzima homodimérica Cu/Zn-superóxido dismutase (Sod1) humana	10
Figura 3. Estrutura tridimensional da enzima tetramérica catalase citoplasmática humana	13
Figura 4. Esquema da estrutura do grupo heme localizado no centro ativo da catalase.....	13
Figura 5. Processos celulares humanos conservados em <i>S. cerevisiae</i>	15
Figura 6. Complexo TAA-1/Fe, o qual apresenta atividade catalase mimética	19
Figura 7. Compostos da classe EUK.....	19
Figura 8. Complexos de ferro não heme com atividade antioxidante contra o H ₂ O ₂	20
Figura 9. Estrutura química dos complexos metálicos: (a) C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ FeN ₃ (C1a) e (b) C ₂₈ H ₃₈ Cl ₂ Fe ₂ N ₄ O ₈ (C1e).....	22
Figura 10. Viabilidade celular da cepa de <i>S. cerevisiae</i> EG103 após a exposição a diferentes concentrações dos complexos C1a e C1e.	30
Figura 11. Viabilidade celular das cepas de <i>S. cerevisiae</i> (a) EG103 e (b) EG118 após tratamento adaptativo com os complexos C1a e C1e e posterior estresse gerado por menadiona.	32
Figura 12. Viabilidade celular das cepas de <i>S. cerevisiae</i> (a) EG103 e (b) EG223 após tratamento adaptativo com os complexos C1a e C1e e posterior estresse gerado por peróxido de hidrogênio.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> empregadas como modelo de estudo.	25
Tabela 2. Concentrações de agente oxidante empregadas.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina 5'-tetrahidrogeno-trifosfato
BMPA	Bis-(2-piridilmetil)amina
C1a	Tricloro[bis-(2-piridilmetil)amin]ferro (III)
C1e	Diclorodi- μ -metoxibis[2-{{(piridin-2-ilmetil)amino}metil} fenolato]diferro (III)
Cat	Catalase
CTA1	Gene que codifica a catalase A peroxisomal
Cta1	Catalase A peroxisomal
CTT1	Gene da que codifica a catalase T citoplasmática
Ctt1	Catalase T citoplasmática
Cu/Zn-Sod	Superóxido-dismutase dependente de cobre e zinco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e⁻	Elétron
EG103	Cepa selvagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
EG118	Cepa mutante em <i>sod1</i> (<i>sod1Δ</i>) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
EG223	Cepa mutante em <i>ctt1</i> (<i>ctt1Δ</i>) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ERO	Espécie reativa de oxigênio
Fe-Sod	Superóxido-dismutase dependente de ferro
HO⁻	Ânion hidróxido
HO[•]	Radical hidroxila
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
Mn-Sod	Superóxido-dismutase dependente de manganês
O₂	Oxigênio molecular
O₂^{-•}	Ânion superóxido
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Salen	Bis(salicilaldeído)etilenodiamina
Sod	Superóxido-dismutase
SOD1	Gene que codifica a superóxido-dismutase citoplasmática
Sod1	Superóxido-dismutase 1 (Cu/Zn-superóxido-dismutase)

SOD2	Superóxido-dismutase 2 (Mn-superóxido-dismutase)
Sod 2	Superóxido-dismutase 2 (Mn-superóxido-dismutase)
YPD 2%	Meio de cultura contendo 1% de extrato de lêvedo, 2% de peptona e 2% de glicose
YPGly 4%	Meio de cultura contendo 1% de extrato de lêvedo, 2% de peptona e 4% de glicerol

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE COMPLEXOS DE FERRO NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

ALUNO: Thaís Prata Terra de Rezende

ORIENTADORES: Marcos Dias Pereira, DQB – Instituto de Química – UFRJ
Thales de Paula Ribeiro, DQB – Instituto de Química - UFRJ

O estresse oxidativo vem sendo amplamente associado a diversas doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, câncer, transtorno bipolar e envelhecimento. Com o objetivo de reduzir os inúmeros danos decorrentes do estresse oxidativo e suas consequências, muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de encontrar novos compostos antioxidantes. Uma das estratégias recentes para reduzir o estresse oxidativo é o desenvolvimento de complexos metálicos com atividade redox. Alguns desses complexos são capazes de decompor espécies reativas de oxigênio, evitando assim as lesões celulares causadas por essas.

Assim, empregando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de dois complexos de ferro, tricloro[bis-(2-piridilmetil)amin]ferro (III) (C1a) e diclorodi- μ -metoxibis[2-[[piridin-2-ilmetil)amino]metil} fenolato]diferro (III) (C1e), em proteger as células contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo. As células foram submetidas a tratamentos com os complexos antes de serem submetidas a condições severas de estresse oxidativo, e então plaqueadas para avaliar a tolerância conferida por esses tratamentos frente às condições de estresse utilizadas.

Nossos resultados indicam que ambos os complexos são capazes de proteger as células da cepa *sod1Δ* contra a ação do $O_2^{\cdot-}$. No entanto, somente C1a foi capaz de aumentar a sobrevivência celular na cepa selvagem quando estressada com $O_2^{\cdot-}$, enquanto C1e não demonstrou prover proteção contra essa ERO. Ambos os complexos foram capazes de aumentar a sobrevivência celular contra o estresse causado por peróxido de hidrogênio em uma cepa selvagem, mas não em uma cepa deficiente em catalase (*ctt1Δ*).

Tomados em conjunto os nossos resultados sugerem que estes dois complexos podem proteger as células contra o estresse oxidativo. Ambos promovem um aumento na atividade da Ctt1, uma vez que foram capazes de promover proteção na presença dessa enzima, mas não na ausência da mesma. Os complexos podem portanto estar ativando essa enzima, promovendo assim proteção às células. Os resultados relativos à Sod1 sugerem que C1a age mimetizando a atividade dessa enzima, uma vez que confere proteção independente da presença da mesma. Já o complexo C1e promove proteção ao $O_2^{\cdot-}$ somente na ausência da Sod1.

Palavras-chave: complexos de ferro, compostos miméticos, antioxidantes sintéticos, estresse oxidativo, catalase, superóxido dismutase, *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Estresse oxidativo	4
2.2	Sistema de defesa antioxidante	7
2.2.1	<i>Sistema enzimático de defesa antioxidante</i>	8
2.2.1.1	Superóxido dismutase	8
2.2.1.2	Catalase.....	11
2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo eucariótico de estudo	14
2.4	Novas substâncias antioxidantes	16
2.5	Complexos com atividade mimética	16
2.6	Complexos de ferro utilizados nesse estudo	21
3	JUSTIFICATIVA	23
4	OBJETIVO	24
5	MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1	Cepas de leveduras utilizadas e condições de cultivo	25
5.2	Determinação da viabilidade celular	26
5.3	Determinação das concentrações de complexo a serem empregadas	26
5.4	Condições de estresse	26
5.5	Tratamentos adaptativos com os complexos estudados	27
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1	Considerações gerais	28
6.2	Complexos estudados	28
6.3	Citotoxicidade dos complexos estudados	29
6.4	Proteção celular ao ânion superóxido	31
6.5	Proteção celular ao peróxido de hidrogênio	33

7	CONCLUSÃO	36
8	BIBLIOGRAFIA	37

1 INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e tumores malignos são algumas das inúmeras patologias que vêm acometendo a população mundial. Estudos demonstram que a incidência dessas patologias está intimamente relacionada às lesões causadas às células, quando submetidas a uma condição denominada estresse oxidativo. Essa se estabelece em decorrência da alta concentração celular de diferentes espécies reativas geradas no metabolismo do oxigênio. Existem diversas moléculas enzimáticas e não enzimáticas, podendo ser de origem natural ou sintética, que apresentam a capacidade de degradar as espécies responsáveis por tais lesões.

Diante dessa conjuntura, é crescente a busca por novos compostos que apresentem a capacidade de neutralizar e eliminar tais espécies reativas, e que, conseqüentemente, possam vir a reduzir a ocorrência de doenças relacionadas às lesões causadas pelas mesmas.

Dentre as estratégias abordadas, uma que vem se destacando é a síntese de complexos capazes de mimetizar o centro ativo de enzimas constituintes do sistema de defesa antioxidante das células (BATINIC-HABERLE, REBOUÇAS e SPASOJEVIC, 2010).

Células de *S. cerevisiae* foram utilizadas como modelo de estudo celular para avaliar a atividade antioxidante de dois complexos de ferro, sintetizados e gentilmente cedidos pelo Professor Adolfo Horn Junior, do Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LCQUI/UENF).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estresse oxidativo

Nos organismos aeróbios, o oxigênio é utilizado comoceptor final de elétrons no processo de respiração celular. Tal fato permitiu que esse metabolismo apresentasse alta eficiência energética frente ao metabolismo fermentativo, utilizado pelas células até o surgimento desse elemento na atmosfera, há cerca de dois bilhões de anos (PEREIRA *et al.*, 2003).

A mitocôndria é uma organela cujo principal objetivo é a geração de energia na forma de ATP a partir de nutrientes. Além disso, a mitocôndria também participa de outros processos, como a biossíntese de moléculas orgânicas e a conversão de biomoléculas (PAN, 2011).

Durante a redução do oxigênio molecular à água é comum que ocorra apenas a redução parcial da molécula de oxigênio, gerando intermediários reativos, os quais podem reagir com essas e ocasionar danos diversos (Figura 1). Esses intermediários reativos são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs). A mitocôndria é a principal fonte dessas espécies reativas, e cerca de 2 a 5% do oxigênio captado pelo organismo é convertido em EROs. Além de formadas no metabolismo aeróbio, as EROs também podem ser originadas a partir de agentes oxidantes exógenos (HERRERO, ROS, BELLÍ, 2008) (PAN, 2011) (MORANO, GRANT, MOYE-ROWLEY, 2012).

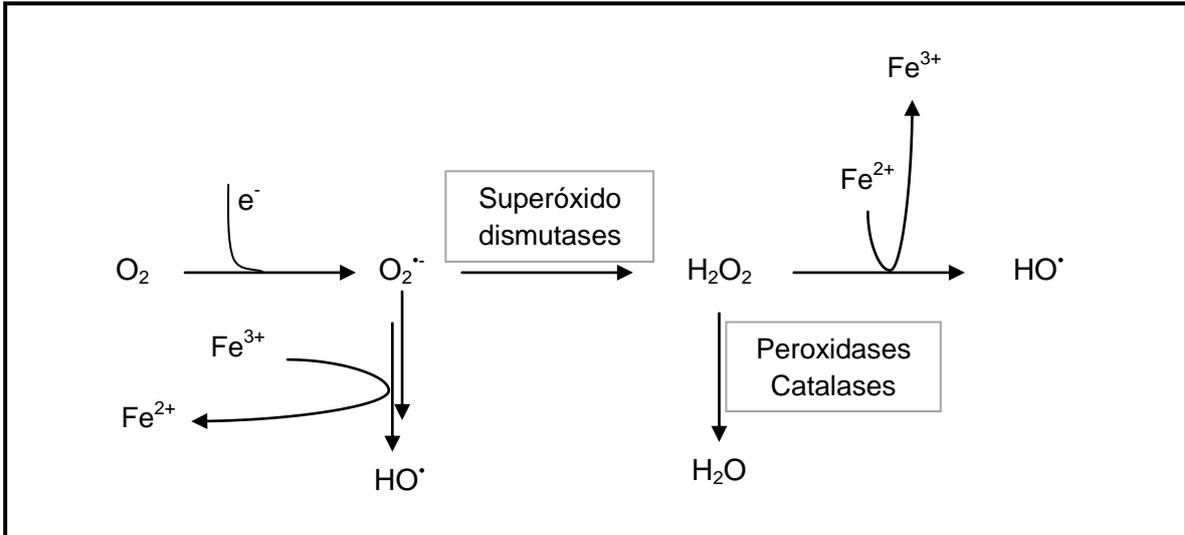


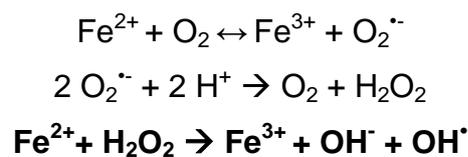
Figura 1. Geração de espécies reativas de oxigênio durante a redução parcial do oxigênio molecular. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é formado a partir do recebimento de um elétron pelo oxigênio molecular. A degradação do ânion superóxido pela superóxido dismutase gera o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez é levado à água por peroxidases e catalases. O peróxido de hidrogênio pode ser reduzido a radical hidroxila por ferro (Fe^{2+}), de acordo com a reação de Fenton. O radical hidroxila também pode ser formado pela reação de Haber-Weiss, onde o radical superóxido é convertido a radical hidroxila catalisado por Fe^{3+} .

O radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (HO^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são as EROs mais importantes geradas pelas células. A formação dessas é inerente ao metabolismo aeróbio, sendo resultado da própria respiração e da beta-oxidação dos ácidos graxos, além de processos inflamatórios e diferentes condições de estresse. Em condições fisiológicas, as EROs desempenham um importante papel na defesa contra patógenos e no controle de mecanismos celulares, como, por exemplo, a divisão celular (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999) (VALKO *et al.*, 2006).

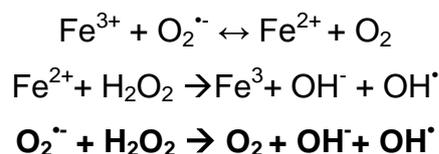
Concentrações de H_2O_2 acima das consideradas fisiológicas podem ser capazes de oxidar os íons Fe^{2+} , e H_2O_2 acaba por ser reduzido a HO^\bullet , de acordo com as reações de Fenton e de Harber-Weiss. O radical hidroxila é um forte agente oxidante e extremamente danoso, sendo capaz de oxidar inúmeras biomoléculas, tais como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (MORANO, GRANT, MOYEROWLEY, 2012).

De acordo com a reação de Fenton, H_2O_2 pode oxidar Fe^{2+} , gerando HO^\bullet e ânion hidróxido (OH^-). A reação de Habber-Weiss mostra que, catalisados por ferro tanto na sua forma oxidada quanto na sua forma reduzida, O_2^- e H_2O_2 podem gerar OH^- , OH^\bullet e oxigênio molecular, o qual pode ser fonte de mais espécies reativas (IUPAC, 1997).

Reação de Fenton:



Reação de Habber-Weiss:



As células, ao longo do processo evolutivo, adquiriram um sistema de defesa antioxidante capaz de lidar com tais espécies, mantendo os níveis dessas em

patamares adequados. Contudo, quando a produção de EROs excede a capacidade de defesa antioxidante da célula, é estabelecida uma condição denominada estresse oxidativo. Sob essa condição, as EROs reagem com diversas biomoléculas, prejudicando a resposta celular e causando inúmeros danos às estruturas celulares, tais como oxidação de proteínas, carboidratos e bases nitrogenadas, peroxidação lipídica, modificações nas cadeias de aminoácidos e modificação do DNA, por exemplo.

Diversos estudos têm relacionado as EROs a inúmeras doenças, como o Mal de Alzheimer e de Parkinson, doenças cardiovasculares e pulmonares, diabetes e câncer, por exemplo (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999), (BATINIC-HABERLE, REBOUÇAS e SPASOJEVIC, 2010), (MORANO, GRANT e MOYE-ROWLEY, 2012).

2.2 Sistema de defesa antioxidante

Com o objetivo de evitar a elevação dos níveis de EROs no organismo e os danos causados pelas mesmas, as células adquiriram diversos mecanismos de proteção celular ao longo de sua evolução, constituindo um complexo sistema de defesa antioxidante.

Esse sistema é altamente especializado, sendo constituído por enzimas e moléculas não enzimáticas capazes de eliminar as EROs ou reparar os danos causados nas moléculas e minimizando assim os danos causados por essas (PEREIRA *et al.*, 2003).

O sistema não enzimático antioxidante conta com moléculas de baixo peso molecular que atuam como antioxidantes, como a glutathiona, e as vitaminas C e E, por exemplo, enquanto o sistema enzimático é constituído por peroxidases, catalases e superóxido dismutases, por exemplo. Além do sistema de defesa antioxidante do organismo, existe ainda inúmeros compostos de origem natural e sintética que podem apresentar atividade antioxidante, minimizando assim os danos causados pelas EROs (VALKO *et al.*, 2006) (HERRERO, ROS e BELLÍ, 2008).

Tão logo o balanço oxidativo celular é alterado, todo um sistema de proteção é ativado, gerando uma resposta inicial imediata. Imediata é também a ativação de um mecanismo de sinalização celular, que por sua vez leva à ativação de uma resposta secundária, resultando na posterior síntese de proteínas e moléculas

envolvidas na proteção celular. As defesas primárias atuam eliminando as EROs e consistem em moléculas antioxidantes, enquanto as defesas secundárias reparam ou removem os produtos de danos oxidativos nas estruturas celulares (MORADAS-FERREIRA *et al.*, 1996) (COSTA e MORADAS-FERREIRA, 2001).

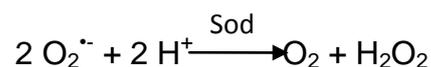
2.2.1 Sistema enzimático de defesa antioxidante

O sistema enzimático de defesa antioxidante consiste em um grupo de enzimas que está relacionado à eliminação das EROs e ao reparo das biomoléculas danificadas por tais espécies.

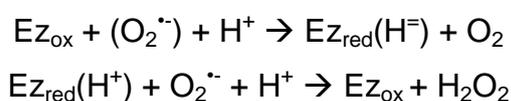
Nesse grupo encontram-se a catalase e a superóxido dismutase, as quais são as principais metaloproteínas envolvidas na eliminação de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$, respectivamente (HERRERO, ROS e BELLÍ, 2008).

2.2.1.1 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (Sod), presente em todos os organismos eucariotos e em algumas bactérias, é a responsável por catalisar a conversão do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2):



Essa conversão é realizada em duas etapas: a primeira consiste na reação do ânion superóxido com o grupo prostético da Sod na sua forma oxidada, ocorrendo a redução da enzima e a formação de oxigênio molecular; já na segunda etapa, a forma reduzida da enzima reage com um segundo ânion superóxido e um próton, liberando H_2O_2 e retornando assim à sua forma oxidada (JOHNSON, F., GIULIVI, C., 2005).



Sua atividade deve-se à atividade redox dos íons metálicos presentes em seu centro catalítico. As isoformas de superóxido dismutase diferem entre si principalmente pela constituição do centro ativo – Cu/Zn, Mn, Fe ou Ni - e por sua localização celular. Por não ser uma espécie neutra, o radical superóxido não é permeável a membranas biológicas, e por isso é necessária a presença de Sods em diferentes localizações celulares. A Cu/Zn-superóxido dismutase (Sod1) (Figura 2), por exemplo, é sintetizada a partir do gene *SOD1*, e é normalmente encontrada na sua forma dimérica no citoplasma e espaço intramembranar mitocondrial e, no caso de mamíferos, também no espaço extracelular, na sua forma tetramérica. A existência de uma isoforma de Sod no espaço extracelular é justificada pela necessidade de uma defesa celular contra fontes exógenas de ânion superóxido. Já a Mn-superóxido dismutase (Sod2) é codificada pelo gene *SOD2* e é localizada na matriz mitocondrial de todos os organismos aeróbios obrigatórios. A Mn-Sod também é encontrada nos organismos anaeróbios facultativos. A Fe-superóxido dismutase e a Ni-superóxido dismutase são encontradas nos organismos procarióticos (FRIDOVICH, 1995) (RILEY, 1999) (BARONDEAU D. P., 2004) (HERRERO, ROS e BELLÍ, 2008) (MIRIYALA *et al.*, 2012)

Apesar de o centro ativo da Sod1 ser composto por cobre e zinco, somente o cobre está envolvido nos ciclos de oxidação e redução na dismutação do ânion superóxido. O zinco, por sua vez, é responsável por manter a configuração do centro catalítico da enzima, facilitando assim todo o processo redox. Acredita-se que a enzima Sod1 também tenha participação na homeostase intracelular de cobre, o que pode, indiretamente, evitar o estresse oxidativo por diminuir a disponibilidade de cobre para possíveis reações homólogas à de Fenton (EL-MISSIRY, EL-SAYED e OTHMAN, 2001).

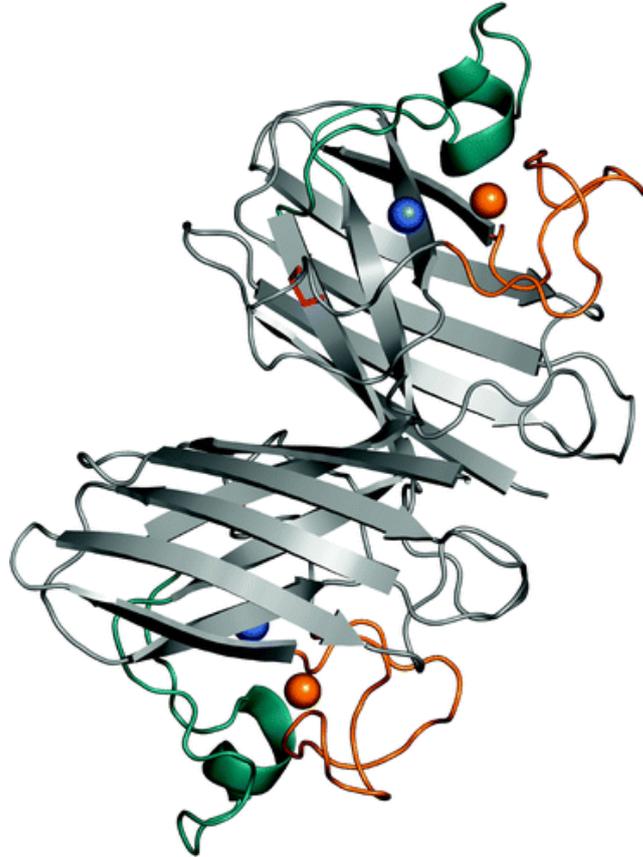


Figura 2. Estrutura tridimensional da enzima homodimérica Cu/Zn-superóxido dismutase (Sod1) humana. Estão representados na figura, em azul e laranja, os íons cobre e zinco, respectivamente (*Disponível em PDB. Acessado em 10/08/2012.*).

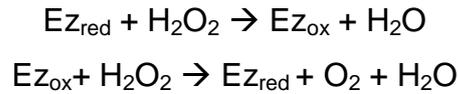
2.2.1.2 Catalase

A catalase foi a primeira enzima a ser descoberta e caracterizada, e está presente em todos os organismos aeróbios. Devido à sua alta conservação evolucionária e sua capacidade de decompor o peróxido de hidrogênio de forma eficiente, a catalase vem sendo apontada como uma das principais enzimas que permitiram que os organismos utilizassem o oxigênio em seu metabolismo sem que sofressem com os efeitos deletérios das espécies reativas que são formadas ao longo do processo de respiração. A catalase é a responsável pela eliminação do H_2O_2 , que, apesar de não apresentar reatividade elevada, é precursor do radical hidroxila, uma ERO extremamente reativa. Essa enzima é encontrada até mesmo em alguns organismos anaeróbios como forma de defesa contra fontes exógenas de H_2O_2 (RAUEN *et al.*, 2004) (LIMOLI *et al.*, 2006) (VALKO *et al.*, 2006).

A catalase presente nos organismos eucarióticos é um tetrâmero e cada uma de suas subunidades apresenta um grupo heme contendo Fe^{3+} no centro catalítico (Figuras 3 e 4). A catalase apresenta alta especificidade para o H_2O_2 , sendo uma das mais eficientes enzimas encontradas em células: uma molécula de catalase é capaz de degradar até aproximadamente 4×10^7 moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo, gerando oxigênio molecular e água. A catalase também pode atuar como uma peroxidase, oxidando pequenas moléculas com capacidade doadora de hidrogênio, como metanol, etanol ou ácido fórmico (RAUEN *et al.*, 2004) (VALKO *et al.*, 2006) (DAY, 2008) (PINTO, MENEZES, 2009).



O Fe^{3+} contido no grupo heme é primeiramente oxidado por uma molécula de H_2O_2 , que se reduz a água. Uma segunda molécula de H_2O_2 é a responsável por reduzir o ferro ao seu estado inicial, Fe^{3+} , formando O_2 e mais uma molécula de água (SUSTMANN *et al.*, 2007).



As células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam duas catalases ortólogas às observadas em mamíferos. A catalase A (Cta1) é localizada no peroxisomo e codificada pelo gene *CTA1*, enquanto a catalase T (Ctt1) é localizada no citoplasma, e é codificada pelo gene *CTT1*. A expressão da *CTA1* é ligada ao metabolismo de ácidos graxos peroxissomais; já a expressão da *CTT1* é induzida por condições de estresse, inclusive o estresse oxidativo (MORADAS-FERREIRA *et al.*, 1996), (MORANO, GRANT e MOYE-ROWLEY, 2012).

A expressão das catalases é reprimida durante a fase de crescimento exponencial, devido à repressão catabólica causada por altas concentrações de glicose. Portanto, somente há a expressão das mesmas quando as células estão submetidas a condições que favoreçam o metabolismo respiratório (MORANO, GRANT e MOYE-ROWLEY, 2012).

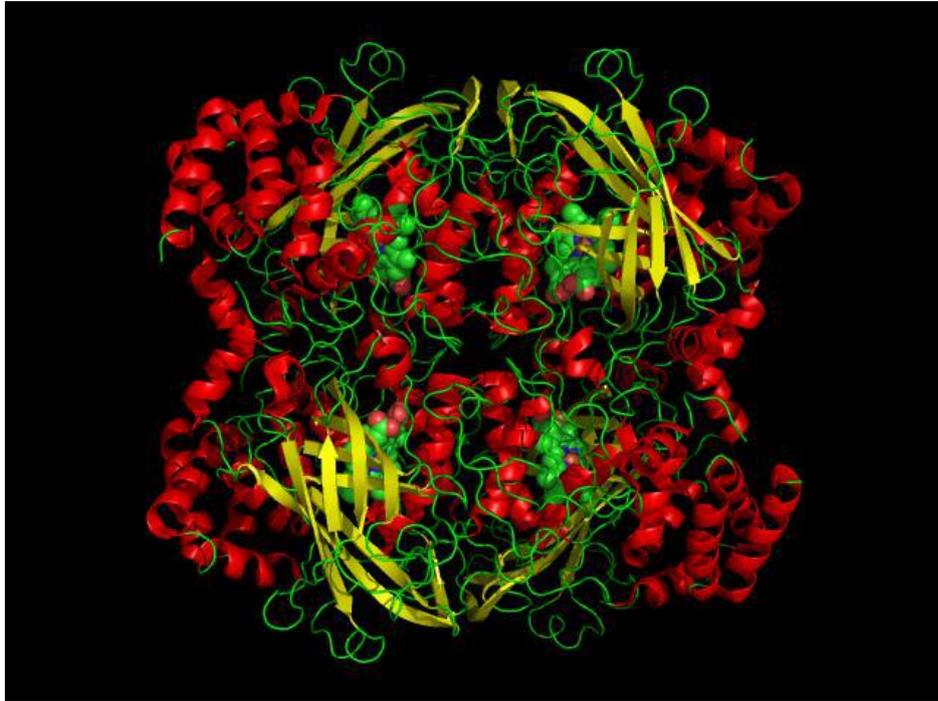


Figura 3. Estrutura tridimensional da enzima tetramérica catalase citoplasmática humana. Os grupos heme estão representados por esferas verdes, azuis e vermelhas (*Disponível em PDB. Acessado em 10/08/2012.*).

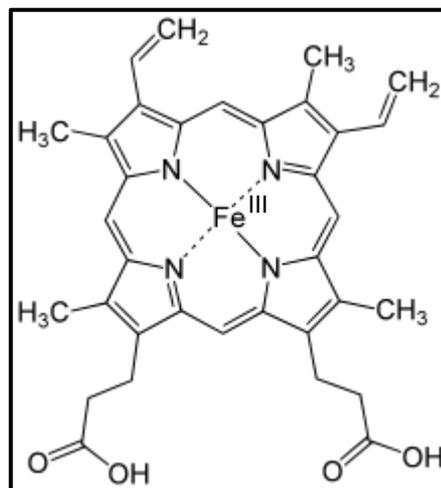


Figura 4. Esquema da estrutura do grupo heme localizado no centro ativo da catalase.

2.3 Saccharomyces cerevisiae como modelo eucariótico de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo unicelular eucariótico de ocorrência no solo, na água, nos vegetais, insetos e animais.

Por ser facilmente cultivada em meio de cultura simples, possuir um tempo de geração pequeno comparado às células animais, e ter seu genoma completamente elucidado, sendo portanto grande a facilidade de obtenção de mutantes através de todas as técnicas de genética clássica e molecular, a *S. cerevisiae* é amplamente utilizada como modelo de estudo eucariótico (PEREIRA *et al.*, 2003).

A *S. cerevisiae* possui inúmeras características que a assemelha às células animais, como o controle do ciclo celular, sistema antioxidante, a capacidade de armazenar glicogênio e a presença do retículo endoplasmático rugoso, do complexo golgiense e de lisossomos, por exemplo. Aproximadamente 30% dos genes relacionados a doenças humanas possuem ortólogos em levedura. Além disso, vários mecanismos observados em células humanas são conservados em *S. cerevisiae* (Figura 8), o que torna a utilização da levedura como modelo de estudo para tais processos (KHURANA e LINDQUIST, 2010) (MAGER e WINDERICHX, 2005).

Outra característica da levedura que desperta grande interesse na sua utilização como modelo eucariótico para estudos é o fato de apresentar duas importantes vias metabólicas. Essas vias estão intrinsecamente ligadas à disponibilidade de nutrientes: quando exposta a elevadas concentrações de glicose, seu metabolismo é fermentativo, e parte do seu sistema respiratório é reprimido por um fenômeno denominado repressão catabólica, que é causada pela glicose. Por outro lado, quando expostas a fontes de carbono não fermentáveis, como o glicerol, por exemplo, passam a apresentar metabolismo respiratório, e é nessa condição que a expressão das enzimas do sistema antioxidante passa a ser completa, para que possam lidar com as EROs produzidas no processo de respiração. Essa característica ganha importância uma vez que, dependendo das condições as quais a *S. cerevisiae* for exposta, pode-se induzir ou não o desenvolvimento de seu sistema antioxidante (PEREIRA *et al.*, 2003) (MORANO, GRANT e MOYEROWLEY, 2012).

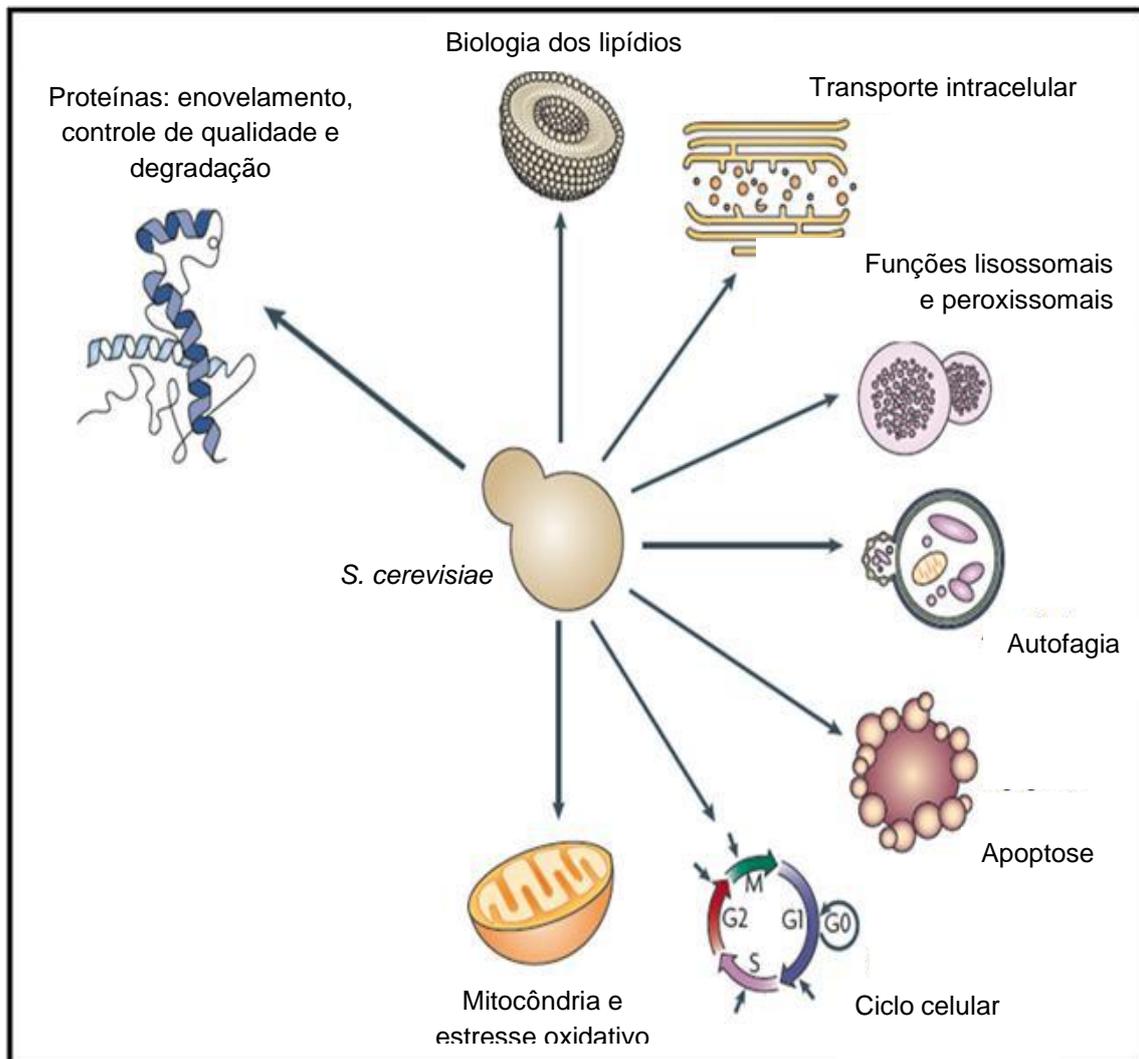


Figura 5. Processos celulares humanos conservados em *S. cerevisiae*. Mecanismos relacionados a proteínas, composição da membrana lipídica, funcionamento das mitocôndrias, geração de EROs, controle do ciclo celular e mecanismo de morte celular programada são algumas das características de células humanas conservadas em *S. cerevisiae* e que podem portanto ser estudadas nesse modelo celular (modificado a partir de KHURANA e LINDQUIST, 2010).

2.4 Novas substâncias antioxidantes

Devido à relação entre os danos oriundos do estresse oxidativo e o desenvolvimento de inúmeras patologias, como o câncer e doenças neurodegenerativas, por exemplo, a busca por novas substâncias que apresentem atividade antioxidante vem aumentando consideravelmente nos últimos anos (BERALDO, 2005).

Muitos estudos abordam a ação de antioxidantes já conhecidos, sendo a maioria deles de origem natural, enquanto outros se atêm ao desenvolvimento de novos compostos com ação antioxidante. Estudos relacionados a complexos com atividade antioxidante vêm se destacando ao longo dos anos, devido à possibilidade de serem empregados no combate aos danos relacionados às EROs.

Complexos metálicos de baixa massa molecular, estáveis em condições fisiológicas e com significativo potencial antioxidante são os que mais têm despertado interesse para o tratamento de males relacionados ao estresse oxidativo (DAY, 2008).

Complexos metálicos, também conhecidos como compostos de coordenação, consistem basicamente em um átomo central que possui pelo menos um orbital vazio capaz de receber elétrons (ácido de Lewis) circundado por átomos, íons ou moléculas capazes de doar elétrons ao átomo central (bases de Lewis), os quais são denominados ligantes. Os ligantes podem ser classificados de acordo com o número de átomos ligados ao íon metálico, podendo ser monodentados, bidentados, tridentados ou polidentados, com um, dois, três ou mais átomos ligados ao íon metálico, respectivamente (SHRIVER *et al.*, 2008).

2.5 Complexos com atividade mimética

Os fármacos derivados de complexos metálicos (metalofármacos) podem apresentar atividade devido: (i) a todo o complexo inerte apresentar atividade; (ii) a todo o complexo reativo apresentar atividade; (iii) a um fragmento do complexo apresentar atividade; (iv) ao complexo liberar um metal ativo; (v) ao complexo liberar um ou mais ligantes ativos; (vi) ao complexo causar sensibilização à radiação, (vii) ao complexo apresentar atividade radioterápica (HAMBLEY, 2007).

Os metalofármacos podem atuar em diferentes alvos e através de diferentes mecanismos. Como muitas das enzimas do sistema antioxidante apresentam íons metálicos em seus centros catalíticos, uma das estratégias que vêm despertando interesse é a de desenvolver complexos metálicos análogos a essas enzimas. Nesse intuito, muitos trabalhos descreveram complexos com potencial antioxidante significativo e/ou atividade mimética às enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase, por exemplo. Esses complexos podem conter nos seus centros catalíticos, metais como manganês, ferro, cobre, zinco, vanádio, lítio e cobalto (RAUEN *et al.*, 2004) (FISCHER, LAU e DECLAN, 2005) (HAMBLEY, 2007) (DAY, 2008).

Uma vez que a enzima superóxido dismutase converte o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, que por sua vez é eliminado pela ação da catalase, o complexo ideal a ser desenvolvido deve apresentar a capacidade de degradar essas duas espécies reativas. O complexo ideal também deve ser solúvel em água, o que significa que, conseqüentemente, deve ser solúvel também em ambiente fisiológico. Também é interessante que o complexo seja permeável à membrana celular, não tóxico e fisiologicamente estável (GONZÁLEZ-ÁLVARES *et al.*, 2005) (LIMOLI *et al.*, 2006).

A remoção das EROs é baseada sobretudo em reações redox. Por essa razão, o desenvolvimento com complexos baseia-se primeiramente em metais com atividade redox e com uma rica química de coordenação (BATINIC-HABERLE, REBOUÇAS e SPASOJEVIC, 2010).

A maioria dos compostos relacionados às enzimas catalase e superóxido dismutase são baseadas em porfirinas de ferro ou manganês. Contudo, ao se utilizar o ferro como metal de coordenação, deve-se atentar à estabilidade do complexo, uma vez que íons ferro não complexados podem, de acordo com as reações de Fenton e de Harber-Weiss, gerar radical hidroxila, que é uma espécie extremamente danosa às células (RAUEN *et al.*, 2004) (BATINIC-HABERLE, REBOUÇAS e SPASOJEVIC, 2010).

Devido às ilimitadas possibilidades de construção de ligantes e à existência de diversas enzimas que apresentam centros do tipo não heme, mono e binucleares, há um número crescente de complexos com ligantes de perfil diferente das porfirinas sendo desenvolvido com o intuito de apresentar atividade semelhante às enzimas do sistema antioxidante. Os derivados de Mn-Salen (Salen =

bis(salicilaldeído)etilenodiamina), como os complexos da classe EUK (Figura 5), têm obtido grande destaque entre os complexos não heme. Relatos na literatura apontam que os Salens apresentam atividades catalase e SOD e têm se mostrado eficientes contra doenças relacionadas ao envelhecimento e estresse oxidativo (LIMOLI *et al.*, 2006) (MUNROE *et al.*, 2007) (DAY, 2008). (BATINIC-HABERLE, REBOUÇAS e SPASOJEVIC, 2010).

Outros complexos também têm apresentado excelentes resultados, como o TAA1-Fe, estudado por Rauen e colaboradores, que promove grande proteção ao estresse causado por peróxido de hidrogênio *in situ* (Figura 6) (RAUEN *et al.*, 2004).

Já Carvalho e colaboradores e Chen e colaboradores, por exemplo, estudaram a atividade antioxidante de complexos de ferro não heme, mononuclear e binuclear, respectivamente (Figura 7), análogos aos utilizados nesse estudo, obtendo resultados positivos quanto à atividade antioxidante contra o peróxido de hidrogênio (CHEN *et al.*, 2001) (CARVALHO *et al.*, 2006b).

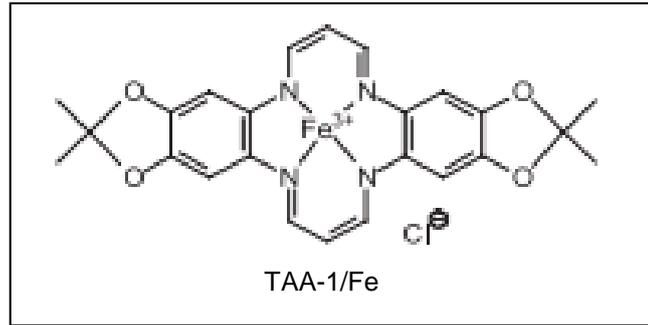


Figura 6. Complexo TAA-1/Fe, o qual apresenta atividade catalase mimética (RAUEN *et al*, 2004)..

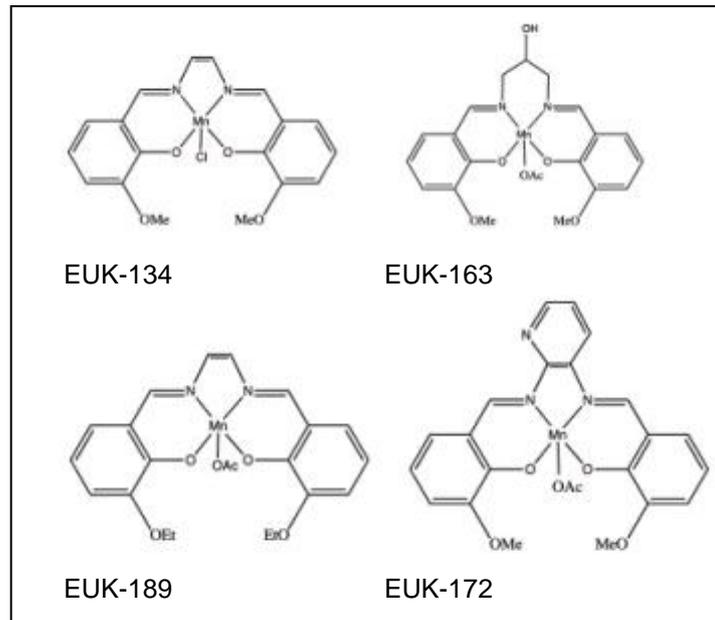


Figura 7. Compostos da classe EUK (LIMOLI *et al.*, 2006).

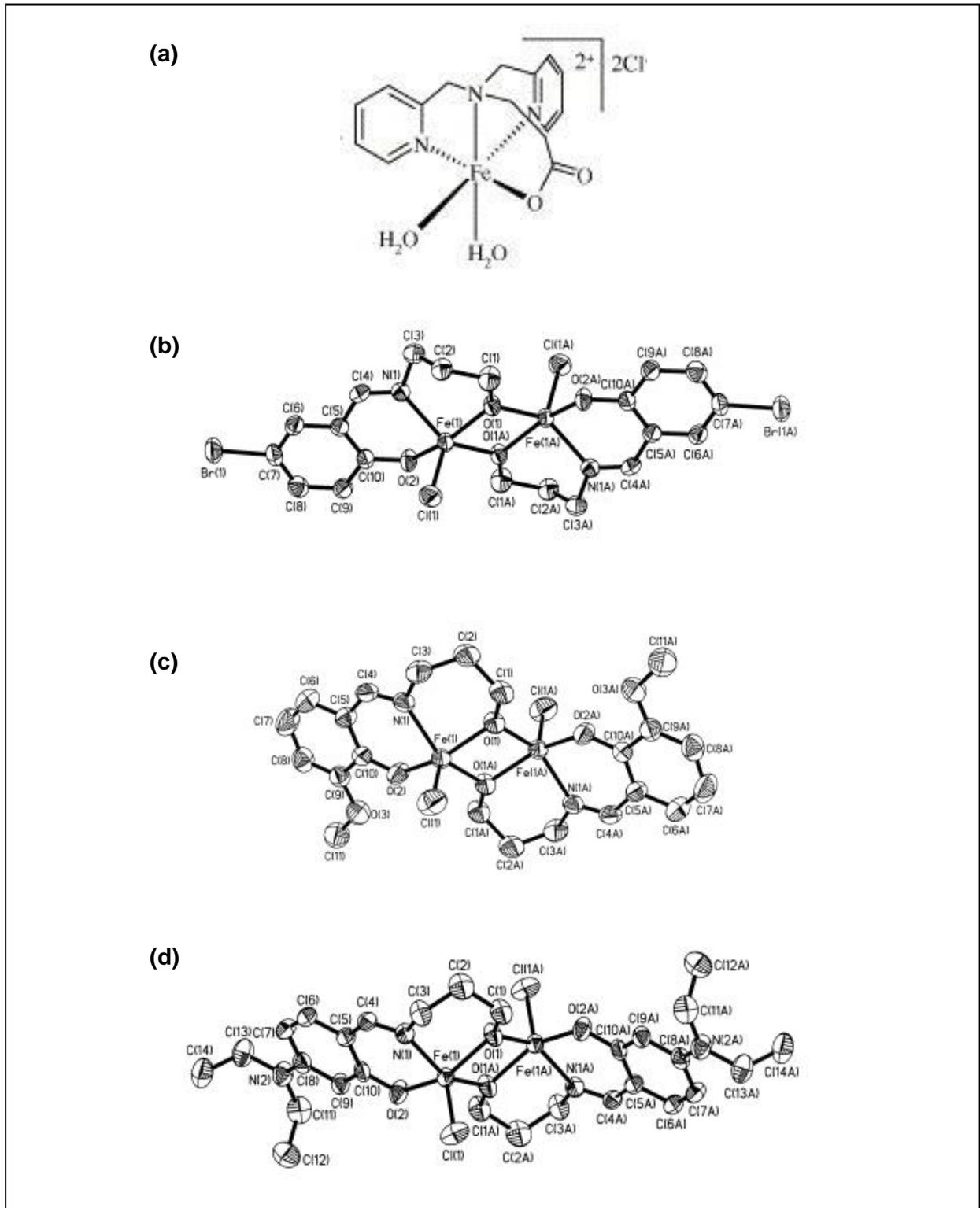


Figura 8. Complexos de ferro não heme com atividade antioxidante contra o H_2O_2 . O complexo (a) foi relatado por Carvalho e colaboradores, enquanto (b), (c) e (d) foram estudados por Chen e colaboradores (CHEN *et al.*, 2001) (CARVALHO *et al.*, 2006b).

2.6 Complexos de ferro utilizados nesse estudo

Os complexos utilizados nesse estudo, tricloro[bis-(2-piridilmetil)amin]ferro (III) (C1a) e diclorodi- μ -metoxibis[2-[(piridin-2-ilmetil)amino]metil]fenolato]diferro (III) (C1e), foram gentilmente cedidos pelo Prof. Adolfo Horn Junior, do LCQUI/UENF, sendo obtidos e caracterizados como reportado na literatura (CARVALHO *et al.*, 2006a) (LUBI, 2011).

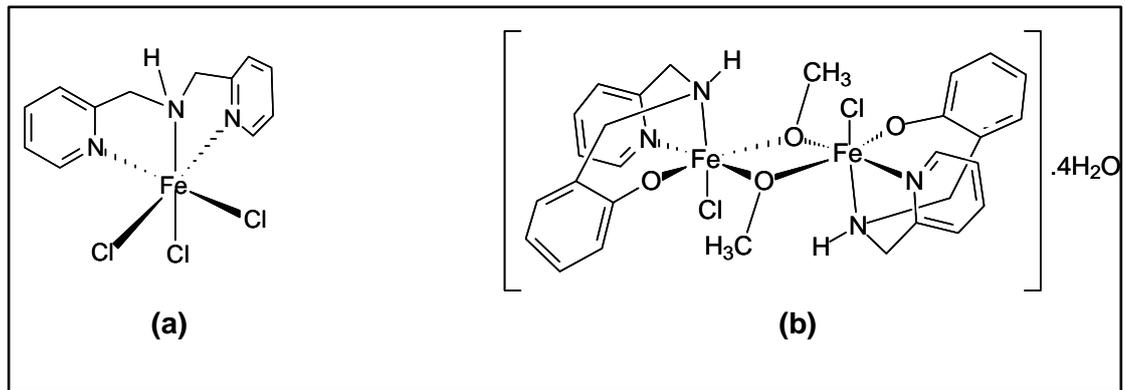


Figura 9. Estrutura química dos complexos metálicos: **(a)** $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_3\text{FeN}_3$ (C1a) e **(b)** $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{Fe}_2\text{N}_4\text{O}_8$ (C1e). Os complexos foram sintetizados, caracterizados e gentilmente cedidos pelo Prof. Adolfo Horn Junior, do LCQUI/UENF

3 JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial, vem crescendo nos últimos anos a incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e ao envelhecimento. Sendo assim, cresce também a cada dia a busca por novas substâncias que reduzam os danos causados por essa condição.

Atualmente, uma das estratégias que vem sendo abordada é o desenvolvimento de compostos de coordenação que possam mimetizar a ação de enzimas antioxidantes.

Dessa forma, este estudo, que se propõe a investigar o potencial antioxidante de dois complexos contendo íons ferro, em células de *S. cerevisiae*, surge como uma tentativa válida de elucidar os efeitos antioxidantes de novos compostos sintéticos. O modelo celular escolhido, *S. cerevisiae*, é amplamente utilizado em estudos relacionados ao envelhecimento e estresse oxidativo, apresentando-se como um excelente modelo eucariótico.

4 **OBJETIVO**

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito antioxidante de dois complexos contendo íons ferro, utilizando a levedura *S. cerevisiae* como modelo de estudo, e, além disso, investigar a possibilidade dos mesmos atuarem mimetizando a atividade das metaloenzimas catalase e superóxido dismutase em condições de estresse oxidativo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cepas de leveduras utilizadas e condições de cultivo

As cepas de *S. cerevisiae* selecionadas para serem utilizadas nesse estudo apresentam deficiência específica na expressão de genes relativos ao sistema de defesa antioxidante celular, e estão listadas na Tabela 1. As cepas foram estocadas em meio YPD 2% sólido (1% de extrato de lêvedo, 2% de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar) em condições apropriadas para evitar a seleção de petites e supressores.

Tabela 1. Cepas de *S. cerevisiae* empregadas como modelo de estudo.

Cepas	Genótipos	Gene em estudo
EG103	<i>MATα, leu2, his3Δ1, trp1-289a, ura3-52, GAL+, mal</i>	Grupo controle
EG118	Isogênica a EG103 exceto por <i>sod1::URA3</i>	<i>SOD1</i>
EG223	Isogênica a EG103 exceto por <i>ctt1::URA3</i>	<i>CTT1</i>

Para todos os experimentos relativos à toxicidade dos complexos metálicos e à superóxido dismutase, nos quais foram utilizadas as cepas EG103 e EG118, as células foram inoculadas em um volume de meio YPD 2% líquido correspondente a 1/5 do volume do erlenmeyer utilizado, a 28 °C e 160 rpm, crescidas até a metade da primeira fase exponencial de crescimento (0,8 a 1,0 mg de células (peso seco)/mL). Para os experimentos relacionados à catalase, onde são empregadas as cepas EG103 e EG223, as células foram cultivadas em meio YPGly 4% líquido (1% de extrato de lêvedo, 2% de peptona e 4% de glicerol) até atingirem a concentração de 0,8 a 1,0 mg de células (peso seco)/mL).

A determinação da concentração celular foi realizada através de turbidimetria, onde é realizada a leitura da absorvância das suspensões celulares a 570 nm, a qual é posteriormente relacionada à concentração celular por meio de uma curva de peso seco (dados não mostrados).

5.2 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através do plaqueamento, em triplicata, em meio YPD 2% sólido, após coleta de 400 µg de peso seco de células e diluição de 1000 vezes. As células foram incubadas a 28°C por 72 h e as colônias foram contadas. A viabilidade celular foi determinada antes e após os tratamentos com os complexos e/ou condições de estresse, e a tolerância foi expressa em porcentagem de sobrevivência, através de uma relação entre o número de unidades formadoras de colônia presentes após e antes do processo de estresse oxidativo.

5.3 Determinação das concentrações de complexo a serem empregadas

As células, cultivadas em meio YPD 2% líquido até a metade do crescimento exponencial, foram expostas a concentrações crescentes dos complexos a serem estudados por uma hora, a 28 °C e 160 rpm. Após o tratamento foi determinada a viabilidade celular com a finalidade de avaliar a toxicidade dos complexos e assim determinar as concentrações ideais a serem empregadas no ensaio de atividade antioxidante *in vivo*.

5.4 Condições de estresse

As células foram submetidas por uma hora, a 28 °C e 160 rpm, às concentrações mínimas não letais de agente oxidante apresentadas na Tabela 2. Tais concentrações foram determinadas por meio de realização de *screening* de concentração nas cepas estudadas (dados não mostrados).

Tabela 2. Concentrações de agente oxidante empregadas.

Enzima em estudo	Agente oxidante	Cepas	Concentração (mM)
Sod1	Menadiona	EG103	30
		EG118	20
Ctt1	H ₂ O ₂	EG103	140
		EG223	70

A determinação da concentração mínima de agente oxidante não tolerada pela célula foi realizada expondo as células, crescidas em meio YPD 2% ou YPGly 4% até a concentração de 0,8-1,0 mg de células (peso seco)/mL, a diferentes concentrações de agentes oxidantes por uma hora, a 28 °C e 160 rpm, e verificando posteriormente a viabilidade celular.

5.5 Tratamentos adaptativos com os complexos estudados

As células foram submetidas por uma hora, a 28 °C e 160 rpm, a tratamento com concentrações não letais dos complexos. As células foram lavadas com água estéril por duas vezes e ressuspendidas em meio original da cultura previamente centrifugado, e então submetidas a estresse oxidativo por uma hora a 28 °C e 160 rpm. Por fim, foi verificada a viabilidade das mesmas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Considerações gerais

Tendo em vista o objetivo de analisar a possível atividade antioxidante de dois complexos de ferro *in vivo*, diferentes cepas de *S. cerevisiae* – selvagem e as mutantes *sod1Δ* e *ctt1Δ* – foram submetidas a tratamento adaptativo com tais compostos. As células foram crescidas até atingirem a concentração de 0,8 - 1,0 mg de células (peso seco)/mL, concentração essa que corresponde à metade da primeira fase exponencial de crescimento em metabolismo fermentativo. Escolheu-se trabalhar nessa fase de crescimento em metabolismo fermentativo, pois, devido ao fenômeno de repressão catabólica causado pela exposição das células a altas concentrações de glicose, a expressão das enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante celular é reprimida. Com o sistema de defesa antioxidante celular ainda não estabelecido é possível avaliar com mais clareza se o possível efeito antioxidante observado deve-se aos tratamentos com os complexos em estudo (SILVA, 2007) (RIBEIRO, 2011).

6.2 Complexos estudados

Nesse estudo foram avaliadas as atividades de dois complexos de ferro com diferentes ligantes, C1a e C1e, em *S. cerevisiae* contra o estresse oxidativo causado por menadiona, geradora de ânion superóxido, e peróxido de hidrogênio. Tais complexos apresentam estruturas semelhantes a de complexos já relatados na literatura com atividade antioxidante, como os estudados por Carvalho e colaboradores e Chen e colaboradores. Espera-se portanto que tais complexos venham a desempenhar alguma atividade antioxidante, devido à analogia estrutural a esses compostos. Carvalho e colaboradores inclusive já relataram em estudos anteriores a ação mimética *in vitro* do complexo C1a à oxigenase e à superóxido dismutase (CARVALHO *et al.*, 2007).

6.3 Citotoxicidade dos complexos estudados

Primeiramente foi verificado se os complexos estudados apresentavam alguma citotoxicidade à cepa EG103 (selvagem). As células foram crescidas em YPD 2% até a metade da primeira fase exponencial, tratadas por uma hora, a 28 °C e 160 rpm, com 10, 50, 100, 500 e 1000 µM dos complexos C1a e C1e, e então foi verificada a viabilidade das mesmas através de plaqueamento em meio YPD 2% sólido, como mostra a Figura 10.

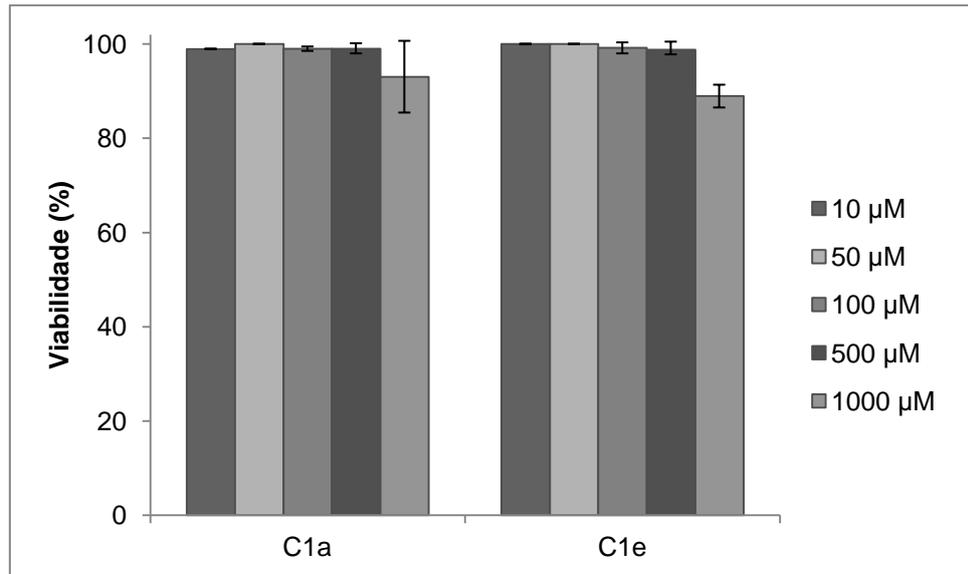


Figura 10. Viabilidade celular da cepa de *S. cerevisiae* EG103 após a exposição a diferentes concentrações dos complexos C1a e C1e (média de três experimentos \pm desvio padrão).

Com base nos resultados observados na Figura 10, pode-se afirmar que os complexos C1a e C1e não foram citotóxicos à EG103 nas concentrações analisadas. C1e apresenta certa citotoxicidade na concentração de 1000 μM ; contudo, tal resultado não é relevante nesse estudo.

Nos estudos referentes a uma possível atividade antioxidante promovida por C1a e C1e, as células foram submetidas a tratamento com 25 μM e 50 μM de complexo, as quais se mostraram concentrações não citotóxicas de acordo com a Figura 10.

6.4 Proteção celular ao ânion superóxido

Para a avaliação da possível proteção proporcionada pelos complexos à exposição ao ânion superóxido, células das cepas EG103 (selvagem) e EG118 (*sod1 Δ*) foram crescidas em YPD 2% até a metade da primeira fase exponencial e tratadas por uma hora, a 28 °C e 160 rpm, com 25 e 50 μM dos complexos C1a e C1e. As células foram lavadas com água estéril por duas vezes para que se retirasse o excesso de complexo do meio, que poderia dismutar o ânion superóxido antes que este fosse assimilado pelas células, e ressuspendidas em meio de cultura original previamente centrifugado. As cepas EG103 e EG118 foram expostas a 30 mM e 20 mM de menadiona, respectivamente (concentrações mínimas letais) por uma hora, a 28 °C e 160 rpm, e então plaqueadas em meio YPD 2% sólido em triplicata para que fosse verificada a viabilidade das mesmas. Os resultados estão apresentados na Figura 11.

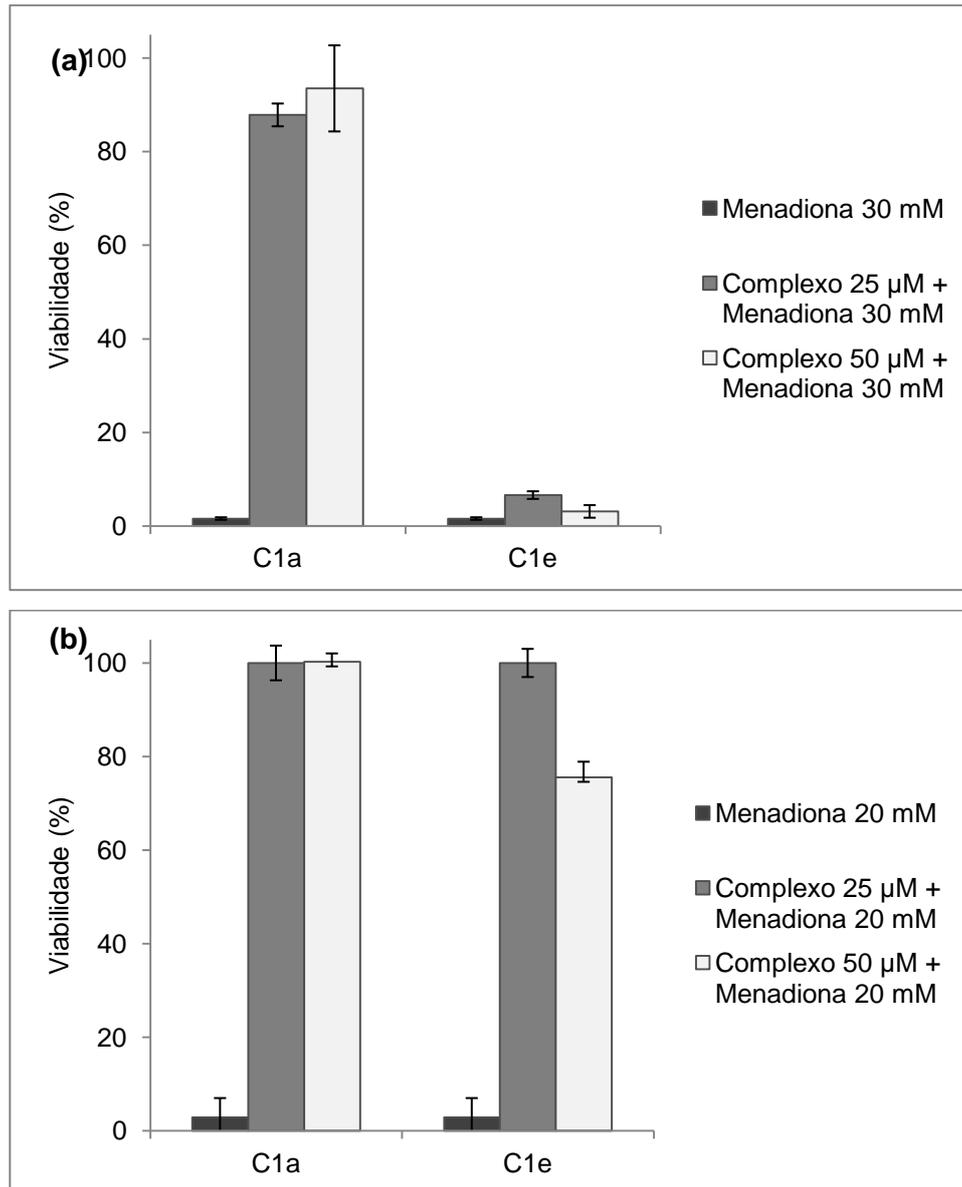


Figura 11. Viabilidade celular das cepas de *S. cerevisiae* **(a)** EG103 e **(b)** EG118 após tratamento adaptativo com os complexos C1a e C1e e posterior estresse gerado por menadiona (média de três experimentos \pm desvio padrão).

Os resultados acima mostram que a cepa EG103 quando tratada com 25 μM do complexo C1e apresenta discreta elevação na tolerância à exposição à menadiona; já quando tratada com 50 μM não há aumento da tolerância à menadiona em relação ao controle negativo. Contudo, o tratamento com C1a aumentou a viabilidade celular para níveis superiores a 80%.

Ambos os tratamentos com os complexos apresentaram um grande aumento da viabilidade após exposição da cepa EG118 ao ânion superóxido. Quando comparados os ensaios realizados com as duas cepas, pode-se observar que C1a confere proteção às duas, mas de forma mais pronunciada na cepa EG118. Já o complexo C1e não promoveu proteção contra o estresse oxidativo à cepa EG103, mas aumentou os níveis de viabilidade da cepa EG118 contra o ânion superóxido para níveis acima de 75%.

6.5 Proteção celular ao peróxido de hidrogênio

Para o estudo da possível proteção antioxidante ao peróxido de hidrogênio foram utilizadas as cepas EG103 e EG223 (*ctt1* Δ).

As células foram crescidas em YPGly 4% até 0,8-1,0 mg de células (peso seco)/mL e tratadas por uma hora, a 28 °C e 160 rpm, com 25 e 50 μM dos complexos C1a e C1e. Foi utilizado o meio de cultura YPGly 4% para que fosse induzido o metabolismo respiratório das células e a consequente expressão do gene da catalase. As células foram lavadas com água estéril por duas vezes para que se retirasse o excesso de complexo do meio e ressuspendidas em meio de cultura original previamente centrifugado. As cepas EG103 e EG223 foram expostas a 140 mM e 90 mM de peróxido de hidrogênio, respectivamente, por uma hora, a 28 °C e 160 rpm, e então plaqueadas em meio YPD 2% para verificar a viabilidade das mesmas. O resultado relativo às cepas EG103 e EG223 estão apresentados na Figura 12.

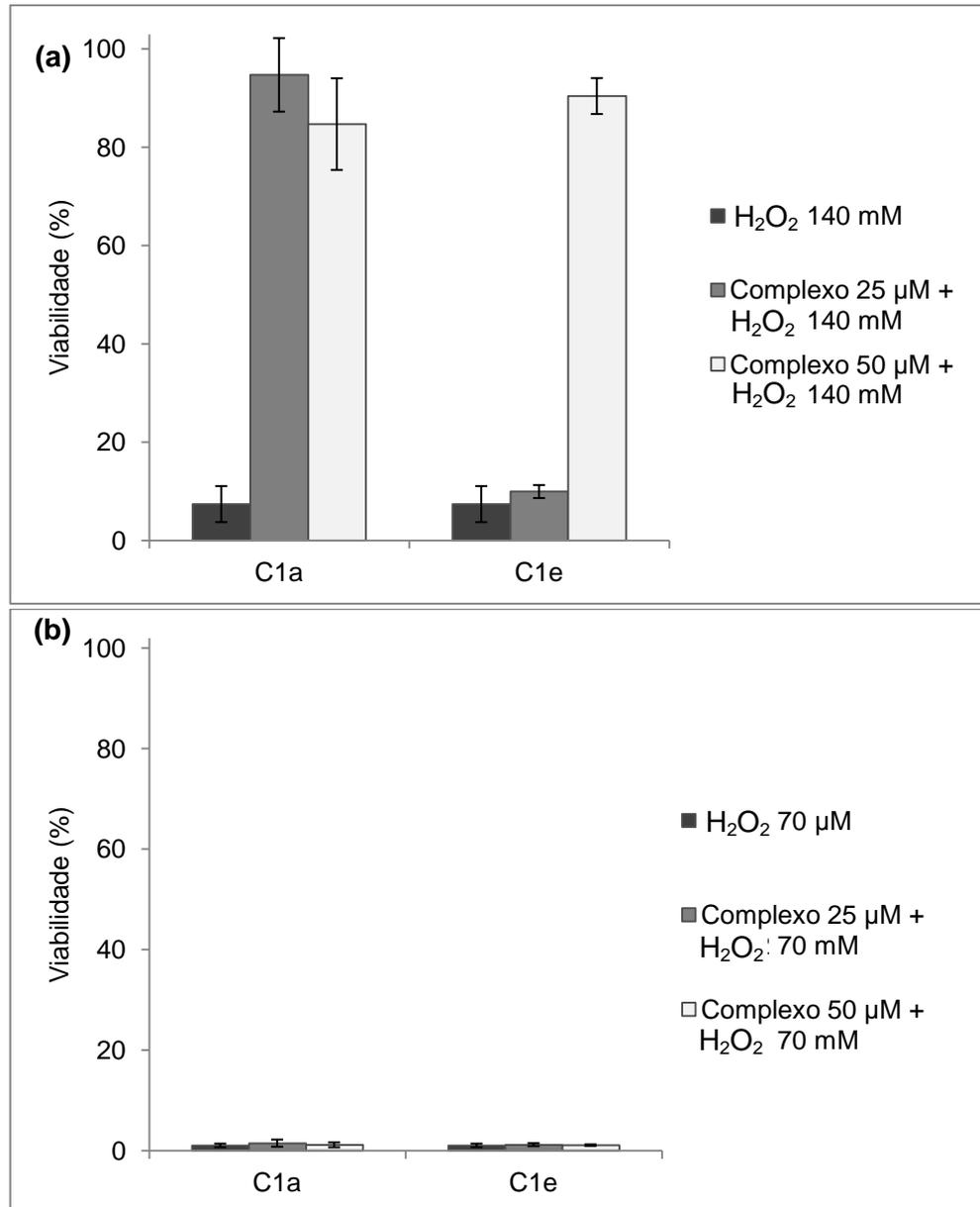


Figura 12. Viabilidade celular das cepas de *S. cerevisiae* (a) EG103 e (b) EG223 após tratamento adaptativo com os complexos C1a e C1e e posterior estresse gerado por peróxido de hidrogênio (média de três experimentos \pm desvio padrão).

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que C1a, em ambas as concentrações, e C1e, na concentração de 50 μM , ofereceram proteção à cepa EG103. Contudo, os 25 μM de C1e não foram suficientes para aumentar a viabilidade celular. Nos experimentos relacionados à cepa EG223, nenhum dos tratamentos com os complexos ofereceram aumento na tolerância frente ao estresse com peróxido de hidrogênio.

Baseado nos resultados observados após esses experimentos, podemos sugerir que a possível proteção conferida à atividade dos complexos metálicos utilizados nesses tratamentos pode estar relacionada à atividade da enzima catalase. Podemos propor esse possível mecanismo de proteção uma vez que, após os tratamentos adaptativos com os complexos metálicos na cepa selvagem EG103, é possível observar um aumento nos níveis de viabilidade celular. A cepa EG103 é capaz de expressar todo o sistema de defesa antioxidante, incluindo a catalase, que é o alvo desses experimentos. Em contrapartida, na cepa mutante EG223, a qual não é capaz de expressar a enzima catalase, não foi observada nenhuma melhora nos níveis de viabilidade celular em relação ao controle negativo de tratamento adaptativo. Sendo a principal diferença entre essas duas cepas a deficiência na expressão dessa enzima, podemos assim sugerir que os efeitos dos complexos estudados sobre as cepas EG103 e a mutante EG223 baseiam-se em algum tipo de interação com a catalase, ou mesmo em um aumento da ativação ou expressão da mesma. Em razão desse provável mecanismo de proteção, nenhuma melhora na defesa antioxidante pôde ser observada na cepa EG223.

Como descrito, a atividade de um complexo pode ser devido ao metal, ao ligante, ou ao complexo como um todo. Não se espera, entretanto, que as atividades observadas nesse trabalho se devam ao metal de coordenação, o ferro, uma vez que esse participa das reações de Fenton e Harber-Waiss, gerando radical hidroxila, que é extremamente reativo. De fato, estudos feitos em nosso laboratório, utilizando o organismo *S. cerevisiae* como modelo de estudo, mostram que o tratamento com sais de ferro não oferece nenhuma proteção contra o estresse oxidativo, bem como diminui a viabilidade celular quando comparado ao controle negativo.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que os tratamentos adaptativos realizados com os complexos C1a e C1e apresentam atividade antioxidante.

O complexo C1a conferiu às células grande tolerância ao ânion superóxido, tanto no ensaio com a cepa selvagem EG103 quanto com a cepa mutante EG118, o que sugere que o complexo substitui o papel da enzima Sod1. O complexo C1e não conferiu tolerância ao ânion superóxido à EG103, mas elevou de forma significativa a tolerância da cepa mutante EG118 a essa ERO.

O complexo C1a, em ambas as concentrações analisadas, e o complexo C1e, a 50 μ M, conferiram tolerância à cepa EG103 ao estresse com peróxido de hidrogênio. No entanto, nenhum dos complexos foi capaz de conferir qualquer tolerância à cepa mutante EG223. Tal resultado sugere que ambos os complexos não apresentam atividade mimética à enzima Ctt1, mas suas atividades antioxidantes estão relacionadas à presença da enzima catalase, uma vez que potencializa de alguma forma a atividade da mesma na cepa selvagem, mas não confere nenhum aumento na tolerância ao peróxido de hidrogênio à cepa sem a presença da catalase.

8 **BIBLIOGRAFIA**

BARONDEAU D. P., K. C. J. . B. C. K. . T. J. A. . G. E. D. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. **Biochemistry**, 43, 2004. 8038-8047.

BATINIC-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIC, I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxid. Redox Signal.**, 13, 2010. 877-918.

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, 2005.

CARVALHO, N. M. F. et al. Synthesis and characterization of three mononuclear Fe (III) complexes containing bipodal and tripodal ligands: X-ray molecular structure of the dichloro[N-propanamide-N,N-bis-(2-pyridylmethyl)amine]iron(III) perchlorate. **Inorg. Chim. Acta**, 359, 2006a. 90-98.

CARVALHO, N. M. F. et al. Synthesis, characterization, x-ray molecular structure and catalase-like activity of a non-heme iron complex: dichloro[N-propanoate-N,N-bis-(2-pyridylmethyl)amine]iron(III). **Inorganica Chimica Acta**, 359, 2006b. 4250-4258.

CARVALHO, N. M. F.; ANTUNES, O. A. C.; HORN JR., A. Electrochemical behaviour of mononuclear Fe (III) complexes as models for oxygenases: reactivity of Fe (II) species electrochemically formed *in situ* toward dioxygen. **Dalton Trans.**, 2007. 1023-1027.

CHEN, W.-H. et al. Dimeric iron (III) complexes with salicylaldimine ligands: structure, magnetic properties, and activity of H₂O₂ disproportionation. **Polyhedron**, 20, 2001. 515-521.

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

DAY, B. J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochemical Pharmacology**, 2008. doi: 10.1016/j.bcp.2008.09.029.

EL-MISSIRY, M. A.; EL-SAYED, I. H.; OTHMAN, A. I. Protection by metal complexes with SOD-mimetic activity against oxidative gastric injury induced by indometacin and ethanol in rats. **Ann. Clin. Biochem.**, 38, 2001. 694-700.

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

FISCHER, A.; LAU, G.; DECLAN, P. Naughton. Lipophilic ionophore complexes as superoxide dismutase mimetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 329, 2005. 930-933.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, 64, 1995. 97-112.

GONZÁLEZ-ÁLVARES, M. et al. Comparison of Protective Effects against Reactive Oxygen Species of Mononuclear and Dinuclear Cu(II) Complexes with N-Substituted Benzothiazolesulfonamides. **Inorg. Chem.**, 44, 2005. 9424-9433.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford: Oxford University Press.**, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, 142, 2004. 231-255.

HAMBLEY, T. W. Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities. **Dalton Trans.**, 2007. 4929-4937.

HERRERO, H.; ROS, R.; BELLÍ, G. . C. E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1780, 2008. 1217-1235.

IUPAC. 1997. 1274; 1277.

KHURANA, V.; LINDQUIST, S. Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? **Nat. Rev. Neurosci.** 11, 2010. 436-449.

LIMOLI, C. L. et al. Using superoxide dismutase/catalase mimetics to manipulate the redox environment of neural precursor cells. **Radiation Protection Dosimetry**, 122, 2006. 228-236.

LUBI, L. M. **Oxidação do ciclexano catalisada por complexos de ferro modelos para metanoxigenase.** Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacases. 2011.

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

MIRIYALA, S. et al. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1822, 2012. 794-814.

MORADAS-FERREIRA, P. et al. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. **Mol. Microbiol.**, 19, 1996. 651-658.

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

MUNROE, W. et al. Only one of a wide assortment of manganese-containing SOD mimicking compounds rescues the slow aerobic growth phenotype s of both *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking superoxide dismutase enzymes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 101, 2007. 1875-1882.

P., B. D. et al. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. **Biochemistry**, 43, 2004. 8038-8047.

PAN, Y. Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: a message from yeast. **Experimental Gerontology**, 46, 2011. 847-852.

PEREIRA, M. D. et al. Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1620, 2003. 245-251.

PINTO, G. F.; MENEZES, R. R. Cinética Enzimática. Rio de Janeiro: E-papers. 2009.

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

RIBEIRO, T. P. **Redução das lesões oxidativas geradas pelo envelhecimento cronológico em células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a tratamentos com novos complexos metálicos**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2011.

RILEY, D. P. Functional Mimics of Superoxide Dismutase Enzymes as Therapeutic Agents. **Chemical Review**, 99, 1999. 2573-2587.

SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, 14, 2004. 271-279.

SILVA, C. G. **Avaliação do potencial antioxidante de extratos de plantas brasileiras e da isoquercetina no modelo de célula eucariótica *Saccharomyces cerevisiae***. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2007.

SHRIVER, D. F., ATKINS, P. W., OVERTON, T. L.; ROURKE, J. P.; WELLER, M. T.; ARMSTRONG, F. A.. **Química Inorgânica**. 4º ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

SUSTMANN, R. et al. Fe(III) complexes of 1,4,8,11-tetraaza[14]annulenes as catalase mimics. **Inorg. Chem.**, 46, 2007. 11416-11430.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiol.**, 552, 2003. 335-344.

VALENTINI, S. et al. Manipulation of *in vivo* iron levels can alter resistance to oxidative stress without affecting ageing in the nematode *C. elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, 133, 2012. 282-290.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact**, 160, 2006. 1-40.

WEI-HSIAN, C. et al. Dimeric iron (III) complexes with salicylaldimine ligands: structure, magnetic properties, and activity of H₂O₂ disproportionation. **Polyhedron**, 20, 2001. 515-521.

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