



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Efeito do Consumo de Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) em Marcadores de Envelhecimento
em Ratos Adultos Suplementados com Ferro

MARCELA DE SÁ BARRETO DA CUNHA

Brasília

2017



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Marcela de Sá Barreto da Cunha

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Nutrição Humana.

Área de concentração: Alimentos, dietética e bioquímica aplicada à Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Fernandes Arruda

Brasília

2017

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Comunicamos a aprovação da tese de doutorado da aluna **Marcela de Sá Barreto da Cunha**, intitulada **“Efeito do Consumo de Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) em Marcadores de Envelhecimento em Ratos Adultos Suplementados com Ferro”**, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

Prof^a. Dr^a. Sandra Fernandes Arruda

Presidente - Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Andreza Fabro de Bem

Membro – Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

Membro – Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Eliane Said Dutra

Membro – Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Kenia Mara Baiocchi de Carvalho

Suplente – Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Brasília

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir existir, colocar em minha vida pessoas tão maravilhosas e ainda e me dar a chance de evoluir em busca de ser uma pessoa melhor.

A minha família pelo suporte e apoio. Por entenderem meu silêncio e ausências em diversos momentos.

A minha avó Mara, pelo amor, companheirismo e dedicação de uma vida inteira. A minha mãe Maria do Socorro, que nesses quatro anos de doutorado me ensinou que devemos sempre nos reinventar, buscar nossas metas e continuar acreditando. A minha irmã Marina, pela amizade e amor, distante, mas ainda reconfortante. Ao meu pai Jairo e à Cida, por cada vibração e momentos de descontração.

À professora Dr^a Sandra, pelo exemplo de profissional e pessoa que é. São quase dez anos de convivência que foram essenciais para toda minha formação acadêmica e pessoal. À professora Dr^a Egle que lá no início da graduação me impulsionou para iniciar na ciência.

Às professoras do departamento de Nutrição da Universidade de Brasília, em especial às professoras Kênia, Marina, Nathália e Teresa que sempre me deram conselhos e suporte quando necessário e vibraram por cada conquista alcançada.

Ao professor Pedro, pela sabedoria, paciência, boa prosa com café e por acreditar que a Nutrição e a Física podem convergir em ciência.

Às minhas amigas da vida, Aline, Sinara, Flor, Amanda e Thalita, que sempre me entenderam, que acreditaram em mim e que estão comigo desde a época da escola. À Lorena, minha querida amiga encontrada nesse percurso tão incerto, pela amizade, pelo silêncio e palavras fundamentais, puxões de orelha e carinho. À Sandra, essa pessoa ímpar, que me aconselhou e me acolheu da melhor maneira possível e me ajudou a enfrentar as pequenas pedras encontradas na trajetória da vida, com palavras sinceras, sem floreios e confortantes. Às meninas da Nutrição, Priscila, Luana, Karina, Ana Paula e Larissa, por todos nossos momentos de descontração. À Izabel, pela amizade com tanta sinceridade e afinidade que surgiu por causa da escrita de um artigo.

À Natália, por dividir todos os momentos e sentimentos durante o doutorado, desde a criação dos animais à elaboração de nossas teses. Aos alunos de graduação (Júlia, Larissa, Clara, Gabriel e Ursila) que passaram pelo laboratório para me ensinar a ensinar e a ter mais tolerância e paciência. À família do Laboratório de Bioquímica da Nutrição, Laís, Mário, Luiz, Thaís, Caio, André, Alessandra, Araújo, Elemárcia, Lara, pelos cafés, almoço, sobremesas e de risadas que alegram a rotina de laboratório.

Aos professores Andreza Fabro de Bem, Otávio de Toledo Nóbrega, Eliane Said Dutra e Kênia Mara Baiocchi de Carvalho por terem aceitado participar da banca de defesa de tese e poder contribuir com análise crítica deste trabalho.

Ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana e aos colegas discentes, por me permitirem crescer enquanto profissional, participando de discussões importantes como representante do corpo discente.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências de Saúde, pelo apoio nos assuntos administrativos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da UnB (DPP-UnB) pela concessão da bolsa de estudos e fomento a pesquisa.

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para que esse projeto de pesquisa e de vida se concretizasse. Muito obrigada!

*“(...) É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito
É saber sonhar
E, então, fazer valer a pena cada verso
Daquele poema sobre acreditar.
Não é sobre chegar no topo do mundo
E saber que venceu
É sobre escalar e sentir
Que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo
E também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo
Em todas as situações (...)”*

Trem Bala – Ana Vilela

RESUMO

Introdução Nas últimas décadas houve um aumento do número de indivíduos idosos na população mundial, sendo necessário o contínuo desenvolvimento de pesquisas e políticas que promovam um envelhecimento saudável. O envelhecimento é um processo biológico caracterizado pelo predomínio de um estado pró-oxidante e pró-inflamatório, associado a menor eficiência das respostas antioxidantes e anti-inflamatórias. Alguns componentes dietéticos, como o ferro e os compostos fitoquímicos, podem alterar as respostas redox e imune e, conseqüentemente, modular o processo de envelhecimento. Desse modo, considerando que o tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) é um fruto do cerrado brasileiro rico em compostos fitoquímicos e com alto potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*, o presente estudo avaliou o efeito do consumo de tucum-do-cerrado nos marcadores moleculares associados ao envelhecimento, em ratos adultos suplementados ou não com ferro dietético. **Métodos** Trinta e dois ratos Wistar machos, adultos, foram tratados por 12 semanas com uma das seguintes dietas: dieta controle (CT; AIN-93G); dieta enriquecida com ferro (+Fe); dieta adicionada de 15% de tucum-do-cerrado (Tuc) ou dieta adicionada de 15% de tucum-do-cerrado e enriquecida com ferro (Tuc+Fe). A concentração de ferro nos tecidos foi determinada por espectrofotometria de emissão atômica e os parâmetros séricos de ferro utilizando kits comerciais. Os níveis de malondialdeído e proteínas carboniladas foram determinados no fígado, baço, intestino e rim e as atividades das enzimas antioxidantes foram determinadas no fígado e no rim, por espectrofotometria. As concentrações séricas de interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) foram determinadas por ELISA. Os níveis de mRNA da hepcidina (Hamp), do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2), da NAD(P)H: desidrogenase-(quinona)1 (Nqo1), da heme oxigenase 1 (Hmox1), da interleucina 1-beta (Il1b), do fator de necrose tumoral-alfa (Tnfa), da proteína marcadora de senescência 30 (Smp30), da sirtuína 1 (Sirt1) e Sirt3 foram determinados no fígado e / ou rim, utilizando o sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR). Os níveis da proteína Nrf2 no fígado, assim como das proteínas SIRT1 e SIRT3 no fígado e no rim, foram determinados por *Western Blotting*. As comparações entre os tratamentos foram feitas utilizando teste de comparações múltiplas (ANOVA) com correção de Bonferroni, sendo considerado estatisticamente diferente o valor de $p < 0,05$. **Resultados** O consumo da dieta enriquecida com ferro (+Fe) promoveu o aumento da concentração de ferro nos tecidos, dos parâmetros séricos de ferro; no fígado, aumentou os danos oxidativos a proteínas, a atividade de superóxido dismutase (SOD), o nível da proteína Nrf2, os níveis de mRNA da Hamp e da Nqo1 e os níveis séricos de IL-6 e TNF- α ; além de ter reduzido os níveis de mRNA da Sirt1 no rim, comparados ao grupo CT. Os ratos tratados com dieta adicionada de tucum-do-cerrado (Tuc) apresentaram redução dos níveis de mRNA hepático da Hamp; aumento da atividade de SOD, dos níveis hepáticos de mRNA da Nfe2l2, Nqo1 e Sirt1, e das proteínas Nrf2 e SIRT1 no fígado, comparados ao CT. A associação de tucum-do-cerrado e ferro na dieta (Tuc+Fe) promoveu a redução dos níveis de mRNA da Hamp no fígado, apesar de não ter alterado o *status* de ferro, quando comparado ao grupo +Fe. No grupo Tuc+Fe foi observado ainda uma redução dos danos oxidativos a proteínas no fígado e de lipídios no rim, e uma redução marginal dos níveis séricos de IL-6, em relação ao grupo +Fe, bem como um aumento marginal da atividade de SOD no fígado, dos níveis hepáticos de mRNA e proteína da Nrf2, de mRNA da Nqo1 e da proteína SIRT1, em relação ao grupo CT; também apresentaram aumento de mRNA da Sirt1 no rim, em relação ao grupo +Fe. **Conclusão** Os resultados sugerem que o consumo de tucum-do-cerrado pode promover um efeito antienvelhecimento ativando a via relacionada à SIRT1-Nrf2, a qual atenua o processo oxidativo e inflamatório induzido pelo excesso de ferro.

Palavras-chave: Tucum-do-cerrado, fitoquímicos, envelhecimento, sirtuínas, Nrf2, estresse oxidativo, inflamação

ABSTRACT

Introduction In the last decades, the number of older people has increased worldwide. Therefore, the continuous development of researches and policies are necessary in an attempt to promote a healthier aging. Aging is a biological process characterized by an increased pro-oxidant and proinflammatory state, associated with inefficient antioxidant and anti-inflammatory responses. Some dietary components, such as iron and phytochemicals compounds, modulate both the redox and immune responses and, consequently, may modulate the aging process. Considering that tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) is a Brazilian savanna fruit rich in phytochemical compounds with a high antioxidant potential *in vitro* and *in vivo*, the present study investigated the effect of tucum-do-cerrado consumption on molecular markers associated with aging, in adult rats supplemented or not with dietary iron. **Methods** Thirty-two male adult Wistar rats were treated for 12 weeks with one of the following diets: control diet (CT, AIN-93G), iron-enriched diet (+ Fe), control diet + 15% tucum-do-cerrado (Tuc) or iron enriched-diet + 15% tucum-do-cerrado (Tuc+Fe). Total iron concentration in tissues was determined by atomic emission spectroscopy and the serum iron parameters were determined using commercial kits. Malondialdehyde and carbonyl protein levels were determined in the liver, spleen, intestine and kidney, and the activity of antioxidant enzymes were determined in the liver and kidney, using spectrophotometry. The serum concentration of the interleukins (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were determined by ELISA. The mRNA levels of hepcidin (Hamp), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nfe2l2), NAD(P)H:dehydrogenase- (quinone) 1 (Nqo1), heme oxygenase-1 (Hmox1), interleukin 1-beta (Il1b), factor, tumor necrosis factor-alpha (Tnfa), senescence marker protein 30 (Smp30), sirtuin 1 (Sirt1) and Sirt3 were determined in the liver and / or kidney by the reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (qPCR). Protein levels of Nrf2 in the liver, as well as the proteins levels of SIRT1 and SIRT3 in the liver and in the kidney, were determined by Western Blotting. The comparisons among the treatments were done using the multiple comparison test (ANOVA) with Bonferroni correction, and a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. **Results** The consumption of the iron enriched-diet (+Fe) promoted an increase of iron concentration in the analyzed tissues and in the serum iron parameters. In the liver, +Fe group showed an increase of protein oxidative damages, superoxide dismutase activity (SOD), Nrf2 protein levels and mRNA levels of Hamp and Nqo1, and IL-6 and TNF- α serum levels; and a decrease in Sirt1 mRNA levels in the kidney, compared with the CT group. The animals treated with the tucum-do-cerrado diet (Tuc) presented lower levels of hepatic Hamp mRNA levels; higher levels of SOD activity, hepatic mRNA levels of Nfe2l2, Nqo1 and Sirt1, and hepatic protein levels of Nrf2 and SIRT1, compared with the CT group. The association of tucum-do-cerrado with iron supplementation (Tuc+Fe) promoted a reduction of hepatic Hamp mRNA levels, but no difference was observed in iron *status* compared to the +Fe group. In Tuc+Fe group, it has been observed a reduction in oxidative damages to hepatic protein and renal lipids, and a marginal reduction in serum IL-6 levels, compared to the +Fe group, as well as a marginally increased hepatic SOD activity, higher mRNA and protein levels of Nrf2, Nqo1 mRNA and SIRT1 protein levels, in relation to the CT group; and also, an increase of the Sirt1 mRNA levels in the kidney, compared to the +Fe group. **Conclusion** These results suggested that tucum-do-cerrado might promote healthier aging by increasing SIRT1 expression and consequently partially activating Nrf2-related pathway, which attenuates oxidative and inflammatory responses.

Keywords: tucum-do-cerrado, phytochemicals, aging, sirtuins, Nrf2, oxidative stress, inflammation

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1. População residente, segundo grupos de idade - Brasil - 1940/2050.** Fonte: IBGE, Censo Demográfico 1940/2000 e Projeção da População Brasil por Sexo e Idade para o Período 2000-2060. *In.*: SIMÕES (2016).
- Figura 2 Absorção de ferro, utilização e exportação de ferro pelo enterócito. Fonte: EVSTATIEV e GASCHE (2012).** DcytB, citocromo B duodenal; DMT-1, transportador de metais divalentes 1; HCP-1, proteína carreadora de heme; HO-1, heme oxigenase-1; Apo-Tf, apo-transferrina; Tf, transferrina.
- Figura 3. Ação coordenada das enzimas antioxidantes.** Fonte: HERMES-LIMA (2004). CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase; GPx, glutathione peroxidase; GSSG, glutathione oxidada; GSH, glutathione reduzida; GR, glutathione reductase; G6PDH, glicose 6 fosfato desidrogenase; NADP⁺, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado; NADPH, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; GST, glutathione S- transferase; ONOO⁻, peroxinitrito; [•]NO, óxido nítrico, O₂^{•-}, radical superóxido; [•]OH, radical hidroxil; OH⁻, íon hidroxila.
- Figura 4. Classes de fitoquímicos.** Fonte: adaptado de ROSA (2013).
- Figura 5. Regulação e ativação do Nrf2 por oxidantes ou fatores dietéticos.** Fonte: adaptado de SURH *et al.* (2005). Keap1, Kelch-like proteína associada à ECH 1; Nrf2, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; EROs, espécies reativas de oxigênio; Cys, cisteína; P, fosforilação; ARE, elemento responsivo a antioxidantes; SOD, superóxido dismutase; GPX, glutathione peroxidase; NQO1, NAD(P)H: desidrogenase-(quinona)1; HO1, heme oxigenase-1.
- Figura 6. Regulação da resposta antioxidante pelas sirtuínas.** Fonte: MERKSAMER *et al.* (2013) – adaptado. Setas indicam regulação positiva, enquanto barras indicam regulação negativa. Linhas sólidas indicam forte evidências experimentais; linhas tracejadas indicam possíveis interações. NFκB, fator nuclear kappa B; FOXO3, *forkhead box* O3; SOD, superóxido dismutase.
- Figura 7. Tucum-do-cerrado coletado em março de 2013, em Terezópolis de Goiás, GO, Brasil.** (Arquivo pessoal).

CAPÍTULO 2

- Figure 1.** **Effect of iron and/or tucum-do-cerrado intake in total iron concentration in the liver, spleen, intestine and kidney of adult rats treated for 12 weeks.** Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). *Statistical differences compared to CT group ($p < 0.05$).
- Figure 2.** **Effect of iron and/or tucum-do-cerrado intake in the hepatic hepcidin (Hamp) mRNA levels quantification in adult rats treated for 12 weeks.** Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). *Statistical differences compared to CT group ($p < 0.05$); § Statistical differences compared to +Fe group ($p < 0.05$).
- Figure 3.** **Effect of iron and/or tucum-do-cerrado intake in oxidative damage in the liver, spleen, intestine and kidney of adult rats treated for 12 weeks. Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$).** *Statistical differences compared to CT group ($p < 0.05$). § Statistical differences compared to +Fe group ($p < 0.05$). MDA, malondialdehyde.
- Figure 4.** **Hepatic mRNA levels quantification of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 gene (Nfe2l2) and protein (Nrf2), NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (Nqo1) and heme-oxygenase 1 (Hmox1) mRNA levels of adult rats treated for 12 weeks.** Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). *Statistical differences compared to CT group ($p < 0.05$). § Statistical difference compared to +Fe group ($p < 0.05$).
- Figure 5.** **Quantification of the levels of hepatic interleukin-1b mRNA (Il1b) and serum protein (IL-1 β), hepatic tumor necrosis alpha mRNA (Tnfa) and protein TNF- α and IL-6 in serum of adult rats treated for 12 weeks.** Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). *Statistical differences compared to CT group ($p < 0.05$).
- Figure 6.** **Hepatic mRNA quantification of Sirt1 and Sirt3 and protein levels determination of SIRT1 and SIRT3 in liver of adult rats treated for 12 weeks.** Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). *Statistical differences compared to CT group ($p < 0.05$). § Statistical difference compared to +Fe group ($p < 0.05$).
- Figure 7.** **Renal mRNA quantification of Sirt1, Sirt3 and Smp30 and protein levels determination of SIRT1 and SIRT3 in kidney of adult rats treated for 12 weeks.** Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). *Statistical differences compared to CT group ($p < 0.05$). § Statistical difference compared to +Fe group ($p < 0.05$).

Figure 8. Proposed mechanism of action of the phytochemical compounds of tucum-do-cerrado in the prevention of aging, by the upregulation SIRT1-Nrf2 pathway, attenuating oxidative stress and inflammation. Tucum-do-cerrado is a source of phytochemical compounds, which might enter the cells and act directly as anti-inflammatory molecules and/or reducing agents, promoting the upregulation of the longevity protein SIRT1. The upregulation of SIRT1 causes the deacetylation of Nrf2, making it stable and active. Nrf2 migrates to the nucleus and induces antioxidant enzymes and its own transcription, rising the cell antioxidant capacity. Then, by the ROS generation and the inflammatory response reduction, tucum-do-cerrado consumption could attenuates of aging process. Ac: acetylation; IL-6: interleukin-6; Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1; Nqo1: NAD(P)H dehydrogenase quinone 1; Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; ROS: reactive oxygen species; SIRT1: sirtuin 1; SOD: superoxide dismutase; TNF- α : tumor necrosis alpha.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** **Composição da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento** (REEVES *et al.*, 1993).
- Tabela 2.** **Composição do Mix Mineral da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento** (REEVES *et al.*, 1993).
- Tabela 3.** **Composição do Mix Vitamínico da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento** (REEVES *et al.*, 1993).
- Tabela 4.** **Composição das rações dos diferentes grupos de tratamento.**
- Tabela 5.** **Sequências de primers utilizados para ensaio de qPCR para os genes Nrf2, Nqo1, Hmox1, Il1b, Tnfa, Smp30, Sirt1, Sirt3 e Actb.**
- Tabela 6.** **Descrição dos tecidos e anticorpos primários utilizados na imunodeteccção de proteínas por *Western Blotting*.**

CAPÍTULO 2

- Table 1.** **Effect of iron and/or tucum-do-cerrado intake in the body weight gain, dietary intake and dietary iron intake of adult rats treated for 12 weeks.** CT, group treated with control diet AIN-93G; +Fe, group treated with AIN-93G diet containing 350 mg of iron /Kg of diet; Tuc, AIN-93G diet added of 15% tucum-do-cerrado; Tuc+Fe, group treated AIN-93G diet containing 350 mg of iron /Kg of diet and added of 15% tucum-do-cerrado. Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 8$). * Statistical differences compared to CT group ($p < 0.05$).
- Table 2.** **Effect of iron and/or tucum-do-cerrado intake in the hematological parameters of adult rats treated for 12 weeks.** CT, group treated with control diet AIN-93G; +Fe, group treated with AIN-93G diet containing 350 mg of iron /Kg of diet; Tuc, AIN-93G diet added of 15% tucum-do-cerrado; Tuc+Fe, group treated AIN-93G diet containing 350 mg of iron /Kg of diet and added of 15% tucum-do-cerrado. Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 8$). *Statistical differences compared to CT group; [§] Statistical differences compared to +Fe group ($p < 0.05$).

Table 3. Effect of iron and/or tucum-do-cerrado in the serum iron parameters of adult rats treated for 12 weeks. CT, group treated with control diet AIN-93G; +Fe, group treated with AIN-93G diet containing 350 mg of iron /Kg of diet; Tuc, AIN-93G diet added of 15% tucum-do-cerrado; Tuc+Fe, group treated AIN-93G diet containing 350 mg of iron /Kg of diet and added of 15% tucum-do-cerrado. UIBC: unbound iron-binding capacity; TIBC: total iron-binding capacity; TS: transferrin saturation; Tf: transferrin. Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). *Statistical differences compared to CT group; §Statistical differences compared to +Fe group ($p < 0.05$).

Table 4. Effect of iron and/or tucum-do-cerrado intake in antioxidant enzymes activity in the liver and kidney of adult rats treated for 12 weeks. Data correspond to average \pm standard deviation ($n = 6$). *Statistical differences compared to CT group; §Statistical differences compared to +Fe group ($p < 0.05$). CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; SOD, superoxide dismutase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione S transferase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAPH: 2'-azobis(2-amidinopropano)
- AIN-93G: Dieta padrão para roedores em crescimento
- AMP: Monofosfato de adenosina
- AMPK: Proteína quinase ativada por AMP
- ARE: Elemento responsivo a antioxidantes
- Caco-2: Linhagem de células de câncer de cólon
- cAMP: AMP cíclico
- CAT: Catalase
- CEUA: Comitê de Ética de Uso de Animais
- ChREBP: Elemento responsivo a carboidratos
- COX2: Ciclooxygenase 2
- CREBP: Proteína de ligação do elemento responsivo a AMP cíclico
- CuZn-SOD: Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
- Dcytb: Enzima citocromo b redutase duodenal
- EGCG: Epigallocatequina galato
- EROs: Espécies reativas de oxigênio
- Fe-S: Centro ferro-enxofre
- Fe/Asc: Ascorbato de ferro
- Fe⁺²: Ferro ferroso
- Fe⁺³: Ferro férrico
- FOXO3: Fator de transcrição *forkhead box O3*
- FPN: Ferroportina
- G6PDH: Glicose 6 fosfato desidrogenase
- GCL: Glutamato-cisteína ligase
- GPx: Glutathione peroxidase
- GR, Glutathione redutase
- GSH: Glutathione reduzida
- GST: Glutathione S- transferase

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HCP1: Proteína carreadora de heme-1

HDAC: Histona desacetilase

HEK293T: Linhagem de células renais embrionárias humanas

HO1: Heme oxigenase-1

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDH2: Isocitrato desidrogenase

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IREs: Elementos responsivos ao ferro

IRP1 e IRP2: Proteínas reguladores de ferro 1 e 2

IκB: inibidor de NFκB

JNK: Fator de transcrição ativador de quinase c-Jun-N-terminal

Keap1: *Kelch-like* proteína associada à ECH 1

K_m: Constante de Michaelis

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MDA: Malondialdeído

Mn-SOD: Superóxido dismutase dependente de manganês

mRNA: RNA mensageiro

NAC: N-acetil cisteína

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADP⁺: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado

NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NAM: Nicotinamida

NFκB: Fator nuclear kappa-B

[•]NO: Óxido nítrico

NQO1: NAD(P)H: desidrogenase-(quinona)1

Nrf2: Fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

O₂: Oxigênio molecular

O₂^{•-}: Ânion superóxido

OH⁻: Íon hidroxila

•OH: Radical hidroxil

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONOO⁻: Peroxinitrito

PARP: Poli (ADP-ribose) polimerase

PFL: *Pool* de ferro lábil

PGC-1 α : co-ativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma

PPARs: Receptores ativadores de proliferação de peroxissoma

RDA: Ingestão Dietética Recomendada

rDNA: DNA ribossômico

RL: Radicais livres

SA- β gal: *Senescence associated- β -galactosidase*

Sir2: *Silent information regulator 2*

siRNA: RNA de interferência

Sirt1: Gene que codifica a proteína sirtuína 1

SIRTs: Sirtuínas

SMP30: Proteína marcadora da senescência

SOD: Superóxido dismutase

TBARs: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Tf: Transferrina

TfR1: Receptor de transferrina 1

Thr: Treonina

TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa

Tyr: Tirosina

VLDL: Lipoproteína de muita baixa densidade

VSMC: Linhagem de células de músculo liso vascular humanas

YPEN-1: Linhagem de células epiteliais humanas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.1.	INTRODUÇÃO	20
1.2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.2.1.	Envelhecimento	23
1.2.2.	Envelhecimento: estresse oxidativo e inflamação	25
1.2.3.	Ferro	29
1.2.4.	Antioxidantes	31
1.2.4.1.	Fitoquímicos e atividade antioxidante	33
1.2.4.2.	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)	37
1.2.5.	Marcadores de envelhecimento	41
1.2.5.1.	Sirtuínas	41
1.2.5.1.1.	Sirtuína 1 (SIRT1)	45
1.2.5.1.2.	Sirtuína 3 (SIRT3)	48
1.2.5.2.	Proteína marcadora de senescência 30 (SMP30)	49
1.2.6.	Tucum-do-cerrado (<i>Bactris setosa</i> Mart)	51
1.3.	OBJETIVOS	54
1.3.1.	Objetivo geral	54
1.3.2.	Objetivos específicos	54
1.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	55
1.4.1.	Aquisição do fruto e preparo das rações	55
1.4.2.	Animais	57
1.4.3.	Protocolo experimental	57
1.4.4.	Consumo de dieta e ganho de peso	58
1.4.5.	Parâmetros hematológicos	58
1.4.6.	Concentração de ferro na dieta e nos tecidos	58
1.4.7.	Status de ferro sérico	59
1.4.7.1.	Ensaio de dosagem de ferro sérico	59
1.4.7.2.	Ensaio de Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF)	59

1.4.7.3	Determinação da Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF), Saturação de Transferrina (ST%) e Transferrina	60
1.4.8	Marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante	60
1.4.8.1	Danos a proteínas: proteínas carboniladas	60
1.4.8.2	Danos a lipídios: peroxidação lipídica	61
1.4.8.3.	Atividade enzimática	62
1.4.8.3.1.	Catalase (CAT)	63
1.4.8.3.2.	Glutathione Peroxidase (GPx)	63
1.4.8.3.3.	Superóxido dismutase (SOD)	63
1.4.8.3.4.	Glutathione Redutase (GR)	64
1.4.8.3.5.	Glutathione S Transferase (GST)	64
1.4.9.	Determinação dos Níveis de Transcritos	65
1.4.9.1.	Extração de RNA Total, Eletroforese, Precipitação com Acetato e Síntese de cDNA	65
1.4.9.2.	Determinação dos níveis de mRNA de genes associados ao metabolismo de ferro, à inflamação e ao envelhecimento	67
1.4.10.	Análise das proteínas Nrf2, SIRT1 e SIRT3 por <i>Western Blotting</i>	68
1.4.11.	Determinação dos níveis séricos de IL-6, IL-1 β e TNF- α por ensaio imunoenzimático (ELISA)	70
1.4.12.	Análise estatística	70
	Referências	71
 CAPÍTULO 2		
2.	Artigo original " <i>Tucum-do-cerrado (Bactris setosa Mart) may promotes anti-aging effect by upregulating SIRT1-Nrf2 pathway and attenuating oxidative stress and inflammation</i> "	85
 CAPÍTULO 3		
3.1.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
3.2.	ANEXO - Certificado da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA)	116

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está estruturada da seguinte forma: **Capítulo 1**, composto pela introdução, revisão bibliográfica, objetivos e materiais e métodos. Em seguida, **Capítulo 2**, com os resultados, discussão e conclusão da pesquisa realizada no doutorado estão apresentados em formato de um artigo original, intitulado “*Tucum-do-cerrado may promotes anti-aging effect by upregulating SIRT1-Nrf2 pathway and attenuating oxidative stress and inflammation*”, submetido ao periódico “*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*”. E, por fim, **Capítulo 3**, com as considerações finais do estudo.

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um crescimento da população de idosos em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um indivíduo é considerado idoso quando apresenta idade superior a 60 anos e é habitante de um país em desenvolvimento, enquanto em países desenvolvidos o indivíduo é considerado idoso quando apresenta idade superior a 65 anos, sendo observado nas últimas décadas crescimento populacional desta faixa etária (WHO, 2017). No Brasil, atualmente, a população idosa corresponde a cerca de 10% do total de brasileiros, enquanto na década de 40 correspondia a apenas de 4,1% da população total. Esse aumento populacional de idosos é decorrente do aumento da expectativa de vida, que no ano de 2015 apresentou um aumento de cerca de 30 anos em relação à década de 40 (IBGE, 2016).

O aumento da expectativa de vida e o conseqüente crescimento populacional desta faixa etária são resultados da associação do avanço de estudos e políticas públicas adotadas que auxiliaram na diminuição da taxa de mortalidade da população (COHEN, 2003). Considerando o crescente aumento da expectativa de vida, é importante que estudos continuem a ser desenvolvidos a fim de auxiliar na promoção da saúde, buscando o desenvolvimento de um envelhecimento saudável, além de propor estratégias de prevenção ou terapias para as doenças associadas ao envelhecimento (LEBRASSEUR *et al.*, 2015).

O envelhecimento biológico é caracterizado pela redução da função celular e da homeostase de órgãos e tecidos, que pode ser decorrente do acúmulo de danos oxidativos a biomoléculas causados por radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como à intensa exposição a estímulos inflamatórios (EDREY e SALMON, 2014; MONTI *et al.*, 2016). Além disso, fatores exógenos como a exposição a radiações ultravioletas e a sobrecarga de minerais como o ferro podem aumentar a produção de RL, gerar o estresse oxidativo e desencadear a inflamação (BOWIE e O'NEILL, 2000; RATTAN, 2006; COPPE *et al.*, 2010), e, deste modo, acelerar o processo do envelhecimento.

Alguns componentes dietéticos encontrados em frutas e hortaliças têm sido associados ao aumento da capacidade antioxidante do organismo e de atenuação da inflamação e, por isso, auxiliam na progressão de um envelhecimento saudável. A literatura sugere, então, que o consumo de frutas e hortaliças ao longo da vida está fortemente associado a uma maior expectativa de vida (LO *et al.*, 2012), melhor qualidade de vida até o envelhecimento, diminuindo o aparecimento de comorbidades

associadas à idade e a progressão do envelhecimento (PARK *et al.*, 2009; GIBSON *et al.*, 2012; FORD *et al.*, 2014). A propriedade destes alimentos em contribuir para um envelhecimento saudável tem sido atribuída à presença de compostos como os carotenoides, vitaminas C e E, e os fitoquímicos, que podem ter efeito antioxidante e também de minimizar a resposta inflamatória (CALABRESE *et al.*, 2010; HODGE *et al.*, 2014; AHMED *et al.*, 2017).

A atividade antioxidante dos compostos fitoquímicos pode ser exercida de forma direta, por quelar minerais que catalisam reações de óxido-redução, sequestrar RL e reduzir as EROs, ou de forma indireta, pela modulação da expressão de genes associados a defesa antioxidante, como, por exemplo, do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (LIU, 2013). O Nrf2 na sua forma ativa induz a transcrição de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (CHUN *et al.*, 2014; DENIS *et al.*, 2015), aumentando a capacidade antioxidante das células. Na inflamação os fitoquímicos podem agir de maneira indireta, ao diminuir o estresse oxidativo e, conseqüentemente, a resposta inflamatória desencadeada pela geração de EROs, ou de maneira direta, pela menor ativação de mediadores inflamatórios e indução de mediadores anti-inflamatórios (LI, W. *et al.*, 2016).

Além disso, compostos fitoquímicos como o resveratrol podem aumentar a expressão e atividade das sirtuínas (SIRT), proteínas desacetilases, chamadas também de proteínas da longevidade. As SIRT regulam várias funções celulares como a resposta inflamatória e antioxidante, a manutenção do genoma, a longevidade e o metabolismo energético (YUAN *et al.*, 2016; ANSARI *et al.*, 2017). Desse modo, sugere-se que o consumo de frutas e hortaliças ricas em compostos fitoquímicos poderiam auxiliar no retardo do envelhecimento, por induzir a expressão e atividade de SIRT, diminuir a inflamação e o estresse oxidativo (NIU *et al.*, 2013; GIBLIN *et al.*, 2014).

Apesar de pouco estudados, os frutos da região do Cerrado brasileiro constituem excelentes fontes de fitoquímicos (MARIN *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2016), dentre os quais destaca-se o tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) por apresentar alto teor de fitoquímicos (SIQUEIRA *et al.*, 2013; BOEING *et al.*, 2017). Considerando que a sobrecarga de ferro pode promover estresse oxidativo, processo inflamatório e potencialmente desencadear o envelhecimento e que os compostos fitoquímicos encontrados nos alimentos são capazes de modular o estresse oxidativo e a inflamação, o presente estudo teve por objetivo investigar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) em marcadores moleculares associados ao envelhecimento em ratos adultos suplementados ou não com ferro dietético. Portanto, a hipótese é que o consumo de tucum-do-cerrado

seja capaz de modular os processos de estresse oxidativo e inflamatório potencializados pela sobrecarga de ferro, por constituir uma fonte de fitoquímicos, e conseqüentemente alterar a expressão de marcadores de envelhecimento, podendo apresentar potencial efeito na prevenção e progressão do envelhecimento.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Envelhecimento

O envelhecimento é um processo lento e gradual caracterizado pela diminuição na função celular resultante do acúmulo de danos teciduais ou consequente perda progressiva da homeostase de tecidos (GOTO, 2008). Essa perda da homeostase e a incapacidade do retorno às funções adequadas do organismo provocam alterações fisiológicas intrínsecas ao envelhecimento (LABAT-ROBERT e ROBERT, 2015; LEBRASSEUR *et al.*, 2015) e é fator de risco para o aparecimento de doenças crônicas como as doenças cardiovasculares, diabetes, doença renal e câncer (VASILOPOULOS *et al.*, 2014).

Em termos demográficos, o envelhecimento populacional é um fenômeno decorrente do declínio das taxas de mortalidade e fecundidade associados ao aumento da expectativa de vida de uma determinada população (CARVALHO e GARCIA, 2003). No Brasil, esse fenômeno teve início no final da década de 60 e, segundo as projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), observa-se aumento de 20% expectativa entre o ano de 1980 e o ano de 2015 (IBGE, 2016). A figura 1 demonstra a diminuição da população residente no Brasil na faixa etária de 0 a 14 anos a partir do ano 2000 e concomitante aumento da população com idade igual ou superior a 60 anos. Essas projeções sugerem que em 2050 a população idosa será de 66,5 milhões de habitantes, correspondendo à cerca de 30% da população do Brasil.

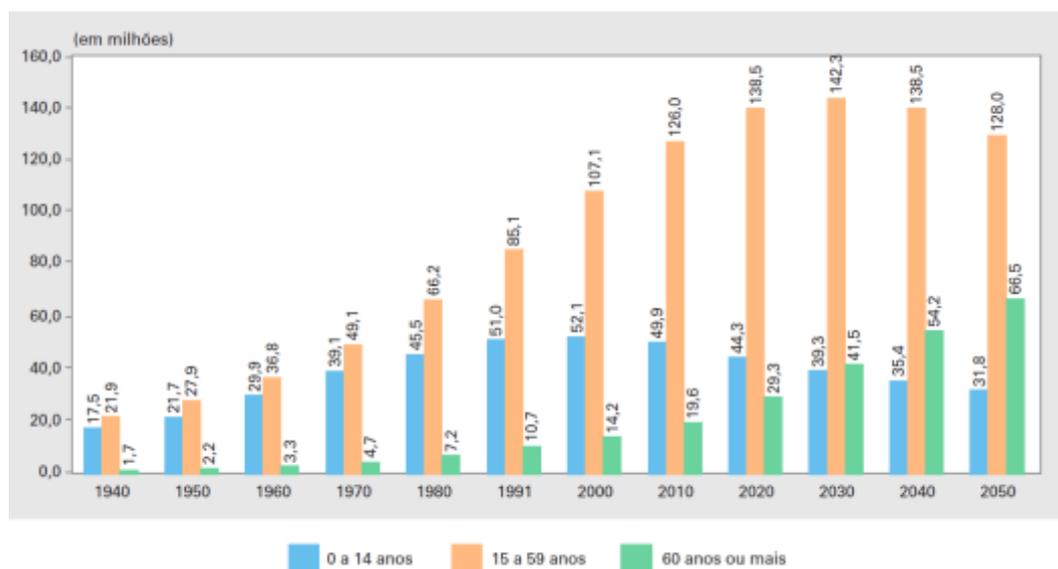


Figura 1. População residente, segundo grupos de idade - Brasil - 1940/2050. Fonte: IBGE, Censo Demográfico 1940/2000 e Projeção da População Brasil por Sexo e Idade para o Período 2000-2060. *In.*: SIMÕES (2016).

A alteração no perfil demográfico e epidemiológico observada na população brasileira provoca aumento com despesas médico-hospitalares, uma vez que idosos necessitam e buscam com maior frequência os serviços de saúde (VERAS, 1994). MIRANDA *et al.* (2016) sugerem que o Brasil não está preparado para arcar com as necessidades decorrentes do envelhecimento populacional. Desse modo, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que visem a prevenção de doenças e promoção da saúde, buscando um envelhecimento populacional ativo e saudável, bem como que auxiliem as políticas socioeconômicas voltadas para a melhoria da qualidade de vida dos adultos e idosos nas próximas décadas.

O envelhecimento tem sido objeto de estudo desde o século XV, entretanto o entendimento sobre a causalidade deste processo biológico ainda é limitado, mas sugere-se que vários fatores estejam envolvidos (PENG *et al.*, 2014; LEBRASSEUR *et al.*, 2015). Diversas teorias foram propostas na tentativa de explicar a causalidade do envelhecimento. As teorias que trazem a visão evolutiva do envelhecimento propõem que o ele seja resultado de um declínio corporal determinado pela seleção natural (WEINERT e TIMIRAS, 2003; FALANDRY *et al.*, 2014), como a teoria da Senescência Programada e a teoria do Soma Descartável, as quais sugerem que o envelhecimento é um processo geneticamente programado que acontece pelo declínio dos sistemas fisiológicos após o auge do período reprodutivo, determinando a expectativa de vida, impedindo a superpopulação e facilitando a evolução por promover uma renovação da população (WEINERT e TIMIRAS, 2003; KIRKWOOD, 2005; FALANDRY *et al.*, 2014).

Apesar das teorias evolutivas buscarem explicar porque o envelhecimento ocorre, estas não explicam o mecanismo pelo qual o envelhecimento acontece. Foram, então, postuladas teorias que procuravam explicar os mecanismos do declínio da função corporal associado ao aumento da idade. A senescência celular pode ser induzida por fatores que causam o estresse celular, sendo compatível com outras teorias que sugerem que o envelhecimento seja causado pelo acúmulo de danos a biomoléculas adquiridos ao longo da vida, como a “teoria do envelhecimento causada por radicais livres” (HARMAN, 1956; WEINERT e TIMIRAS, 2003). As maiores fontes de danos relacionadas ao envelhecimento celular são os radicais livres (RL) e as espécies reativas de oxigênio (EROs), formados à partir de estímulos externos e como consequência do metabolismo celular envolvendo oxigênio, metais e outros metabólitos; glicose e seus metabólitos e sua interação com EROs; e erros

espontâneos em processos bioquímicos, como duplicação do DNA, modificações transcricionais, pós-transcricionais, traducionais e pós-traducionais (RATTAN, 2006).

1.2.2. Envelhecimento: estresse oxidativo e inflamação

Uma das principais teorias desenvolvidas para explicar a causa do envelhecimento é a “teoria do envelhecimento causada por radicais livres (RL)”, proposta por Harman na década de 50, que sugere que o estabelecimento do envelhecimento é decorrente do acúmulo de danos oxidativos em órgãos e tecidos, causado por RL gerados por processos metabólicos que utilizam o oxigênio (HARMAN, 1956). Apesar dessa teoria ter passado por várias revisões e ajustes, o conceito básico de que o acúmulo progressivo de danos celulares causados por RL no decorrer da vida determinaria o envelhecimento ainda é considerado válido na literatura atual (RATTAN, 2006; EDREY e SALMON, 2014).

Os radicais livres (RL) são quaisquer átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, que pode ser capaz de reagir com qualquer composto próximo a fim de se tornar estável (HALLIWELL, 2006). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas que apresentam um oxigênio em um estado altamente reativo. Dentre esses, incluem o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 2006). As EROs são produzidas a partir da redução parcial do oxigênio e por estarem em um estado altamente reativo podem causar danos a biomoléculas. Mais de 90% das EROs produzidas no ambiente celular é produzida na mitocôndria pelo escape de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, que combinados com o oxigênio molecular (O_2) podem produzir ânions superóxido, se houver a redução por um elétron, ou produção de peróxido de hidrogênio, caso haja a redução por dois elétrons (FINKEL e HOLBROOK, 2000).

Apesar de certos níveis de EROs serem decorrentes de processos fisiológicos, a produção excessiva destes compostos está relacionada à geração a danos oxidativos a biomoléculas, como quando o ocorre o estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre como consequência do desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e as defesas antioxidantes, havendo geração aumentada de EROs (BETTERIDGE, 2000). O acúmulo de danos ao longo da vida está associado ao desenvolvimento de doenças crônicas e ao envelhecimento (RATTAN, 2006; PEREZ *et al.*, 2009).

Algumas evidências que sustentam essa teoria incluem a existência de uma correlação positiva entre o aumento da idade e os níveis de produção de EROs, uma vez que com o aumento da idade são observados maiores níveis de danos oxidativos e diminuição da capacidade antioxidante total (ARRUDA *et al.*, 2013; EDREY e SALMON, 2014) e evidências de que alguns antioxidantes são capazes de diminuir os danos oxidativos, com consequente aumento da longevidade (CALABRESE *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2014). Um estudo de coorte, com oito anos de seguimento, realizado por SCHOTTKER *et al.* (2015), com 2.932 participantes com idades de 70 a 120 anos, observou que havia associação entre o aumento da idade e maiores níveis de um marcador de geração de espécies reativas e menor nível da capacidade antioxidante, independente do estado de saúde desses indivíduos, trazendo evidências epidemiológicas para a “teoria do envelhecimento causada por radicais livres”.

Observa-se que quando as EROs são produzidas em células eucarióticas em níveis elevados, alguns mecanismos celulares são ativados para combater os efeitos tóxicos destas moléculas, os quais envolvem mudanças na expressão de genes e ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa-B (NFκB) (BOWIE e O'NEILL, 2000; HADDAD, 2002; MORGAN e LIU, 2011). O NFκB é um fator de transcrição que participa da regulação de inúmeros genes envolvidos na resposta a patógenos e mecanismos de defesa celular (BOWIE e O'NEILL, 2000). A literatura descreve que na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de radical hidroxil ([•]OH), uma via de sinalização é deflagrada e há dissociação do inibidor de NFκB (IκB), com liberação e translocação do NFκB para o núcleo. O NFκB, por sua vez, ativa citocinas como a interleucina (IL)-1 e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), as quais induzem o fígado a produzir e secretar várias proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa, proteína amiloide A sérica, fibrinogênio, que induzem uma resposta inflamatória sistêmica (BOWIE e O'NEILL, 2000; HADDAD, 2002).

O aumento de marcadores de inflamação, como IL-1β, IL-6 e TNF-α, tem sido observado com o aumento da idade (BRUUNSGAARD *et al.*, 2003; GIOVANNINI *et al.*, 2011; NAMAS *et al.*, 2013). Embora não haja consenso se a inflamação causa o estresse oxidativo ou se o estresse oxidativo desencadeia a resposta inflamatória, sabe-se que ambos são processos inter-relacionados, uma vez que a inflamação crônica está associada a níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e cascatas de resposta anti-inflamatórias estão associadas à diminuição da concentração de espécies reativas de oxigênio (REUTER *et al.*, 2010). Nesse contexto, insere-se a “teoria molecular da inflamação no

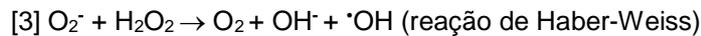
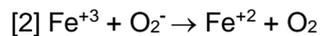
envelhecimento”, a qual sugere que a ativação de fatores de transcrição sensíveis ao estresse oxidativo aumenta a expressão de genes pró-inflamatórios, envolvendo, então, a hipótese de que estresse oxidativo e inflamação estão associados ao envelhecimento (FERRUCCI *et al.*, 2004; COPPE *et al.*, 2010).

Com o aumento da idade, a resposta inflamatória é alterada e, frequentemente, é acompanhada por um nível baixo e crônico de inflamação, mesmo na ausência de um estímulo externo (FRANCESCHI *et al.*, 2000; HASEGAWA *et al.*, 2000; NAMAS *et al.*, 2013). Essas alterações do estado inflamatório não são observadas apenas em indivíduos idosos, uma vez que a literatura descreve mudanças do perfil de secreção de citocinas em experimentos com humanos e animais ainda na idade adulta, indicando que essas alterações são características contínuas do processo de envelhecimento (KOHMAN *et al.*, 2010; ALVAREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2012; NAMAS *et al.*, 2013).

Corroborando com as teorias de envelhecimento relacionadas ao estresse oxidativo e inflamação, uma meta-análise realizada a partir da reunião dos resultados de diversos modelos animais de envelhecimento evidenciou que há aumento da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e diminuição das vias de ativação de enzimas antioxidantes. Observou-se que, na maioria dos estudos, com o envelhecimento ocorre a ativação da via das proteínas de fase aguda e diminuição da via do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), esta última relacionada à ativação da resposta celular antioxidante (LEE *et al.*, 2012).

A produção de RL e EROs também pode ser mediada por metais capazes de catalisar reações de óxido-redução, como o ferro e o cobre, sendo o primeiro de maior destaque por estar mais disponível no organismo (HOHN *et al.*, 2016). Apesar de ser um elemento essencial para o organismo e ter o metabolismo finamente regulado, com o aumento da idade há maior disponibilidade de ferro na sua forma livre (íons de ferro “lábil”) (DOULIAS *et al.*, 2008). Na sua forma livre, o ferro é capaz de participar de reações de geração de moléculas pró-oxidantes, causando danos oxidativos a biomoléculas (GALARIS *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2012; ARRUDA *et al.*, 2013). O ferro em excesso pode também ser um potencial desencadeador da inflamação (CRICHTON *et al.*, 2002; WEISS, 2005), uma vez que o acúmulo deste mineral nos tecidos está associado ao aumento da habilidade da célula produzir EROs, que por sua vez induzem o aumento de citocinas inflamatórias (XIONG *et al.*, 2004).

Quando o ferro se encontra livre na sua forma reduzida (Fe^{+2}), esse íon é capaz de participar da reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzindo radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), reação conhecida como Reação de Fenton (equação 1). Haber e Weiss sugeriram que radicais hidroxil, peróxido de hidrogênio e radicais superóxido sofrem uma reação em cadeia resultando na conversão do peróxido de hidrogênio em radical hidroxil, reação conhecida como reação de Haber-Weiss (equação 2), a qual seria responsável pela geração da maioria das EROs no organismo (HALLIWELL, 2006). O radical $\cdot\text{OH}$ é a espécie reativa de oxigênio mais tóxica e reativa, podendo reagir e causar danos a biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA (HALLIWELL, 2006).



No contexto do envelhecimento, o ferro pode ser tanto causa como consequência do estresse oxidativo associado ao envelhecimento, uma vez que com o envelhecimento há aumento da concentração de ferro nos tecidos e do ferro lábil, que pode ser mobilizado, participar de reações de óxido-redução e contribuir para a geração de danos oxidativos. Por outro lado, o acúmulo de danos oxidativos no decorrer da vida pode provocar liberação do ferro associado a proteínas, aumentando a concentração de ferro lábil, que por sua vez contribui para a geração de danos oxidativos, sendo um ciclo que leva à progressão do envelhecimento (XU *et al.*, 2010; MALLIKARJUN *et al.*, 2014).

Um estudo realizado por DOULIAS *et al.* (2008) avaliou a concentração do *pool* de ferro lábil (PFL) em células brancas de indivíduos saudáveis de diferentes faixas etárias, e, observou uma correlação positiva entre o aumento PFL e a idade, sugerindo então que as células de indivíduos com idade maior estão mais suscetíveis ao estresse oxidativo causados pelo ferro. XU *et al.* (2012) observaram, em modelo animal, resultados semelhantes. Foi verificado que ratos idosos apresentavam maiores níveis de ferro não-hêmico e de marcadores de danos oxidativos a lipídios e ao DNA no músculo esquelético quando comparados a ratos jovens. Corroborando com esses estudos, ARRUDA

et al. (2013) verificaram que ratos idosos tratados com dieta suplementada com ferro por três meses apresentaram maiores níveis de marcadores de estresse oxidativo e inflamação, quando comparados aos ratos da mesma idade tratados com dieta controle, sugerindo que a suplementação de ferro poderia acelerar o processo do envelhecimento.

1.2.3. Ferro

O ferro é o quarto elemento mais abundante da terra, essencial para a maioria dos seres vivos, atuando como um cofator de vários processos biológicos, em função de sua capacidade de oxidação e redução. Indivíduos saudáveis em idade adulta apresentam cerca de 4 a 5 g de ferro corporal, sendo que 65% deste está presente na hemoglobina, participando do transporte de oxigênio, de 30 a 35% estocado no fígado, associado à proteína de estoque ferritina, e de 1 a 2% como componente de grupos prostéticos (centro ferro-enxofre / Fe-S) ou associados ao grupo heme de proteínas (EVSTATIEV e GASCHÉ, 2012).

O ferro dietético é composto pelo ferro hêmico, encontrado em alimentos de origem animal associado ao grupo heme na sua forma reduzida (Fe^{+2}), e pelo ferro não-hêmico presente em vegetais na forma de ferro inorgânico, Fe^{+3} . Apesar da ingestão média diária de ferro variar de 10 a 15 mg, apenas 1 a 2 mg é absorvido (WANG e PANTOPOULOS, 2011). As necessidades diárias de ingestão de ferro variam de acordo com o sexo e estágio de vida, e como a quantidade de ferro absorvida é incapaz de suprir as necessidades para a eritropoiese (20 a 25 mg), faz-se necessária a reciclagem de ferro a partir de eritrócitos senescentes (EVSTATIEV e GASCHÉ, 2012).

O ferro quando obtido a partir de alimentos de origem vegetal, na forma Fe^{+3} , deve ser reduzido a Fe^{+2} pela enzima citocromo b redutase duodenal (Dcytb), encontrada na borda em escova do enterócito (Figura 2), e é então transportado para o interior do enterócito pelo transportador de metais divalente-1 (DMT1) (WANG e PANTOPOULOS, 2011). O ferro-hêmico é absorvido pela proteína carreadora de heme-1 (HCP1) e é dissociado do anel de porfirina pela enzima heme oxigenase-1 (HO1) para posteriormente ser liberado na forma reduzida. No enterócito o ferro pode ser utilizado pela própria célula, estocado associado à proteína ferritina ou exportado para corrente sanguínea pela proteína ferroportina (FPN). Ao ser exportado na membrana basolateral do enterócito o Fe^{+2} é novamente oxidado pela proteína hefaestina e transportado na corrente sanguínea associado à proteína sérica

transferrina (Tf), que é capaz de se ligar a até dois átomos de ferro. A Tf mantém o ferro solúvel para que possa ser transportado na corrente sanguínea e também impede que esse mineral fique livre, limitando a formação de EROs (EVSTATIEV e GASCHE, 2012).

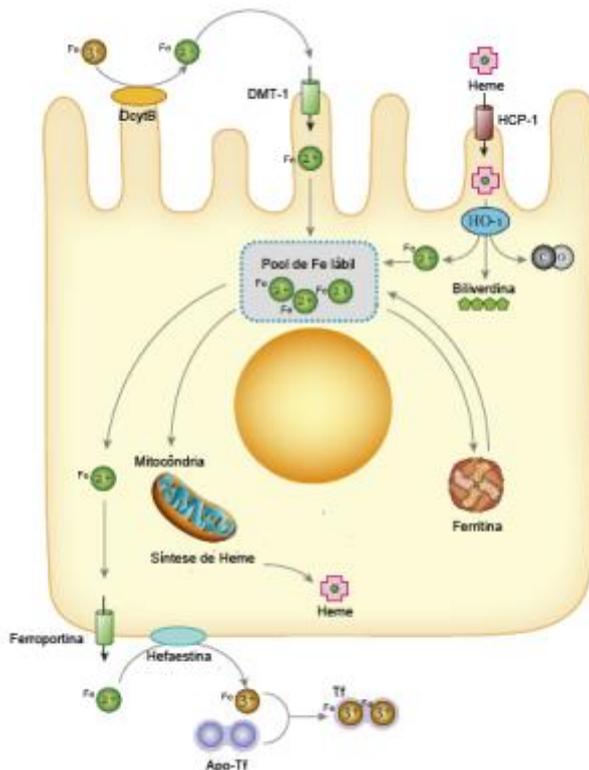


Figura 2. Absorção de ferro, utilização e exportação de ferro pelo enterócito. Fonte: EVSTATIEV e GASCHE (2012). DcytB, citocromo B redutase duodenal; DMT-1, transportador de metais divalentes 1; HCP-1, proteína carreadora de heme; HO-1, heme oxigenase-1; Apo-Tf, apo-transferrina; Tf, transferrina.

O ferro ligado a Tf é absorvido pelas células pela ligação da Tf ao seu receptor (receptor de transferrina 1, TfR1) por endocitose. Após a liberação do ferro reduzido no citosol, o TfR1 retorna à membrana celular para que possa ser utilizado novamente. Do mesmo modo que no enterócito, o ferro pode ser utilizado pela própria célula, estocado ou exportado via FPN. Quando liberado na corrente sanguínea é novamente oxidado pela proteína plasmática ceruloplasmina, para então ser ligado a Tf (EVSTATIEV e GASCHE, 2012).

A homeostase deste mineral é mantida pelo controle da absorção e exportação de ferro pelos enterócitos e liberação do ferro reciclado pelo sistema retículo-endotelial do baço e do fígado. Em nível celular, a regulação envolve a interação dos elementos responsivos ao ferro (IREs) presentes no mRNA de algumas proteínas envolvidas no metabolismo de ferro e das proteínas reguladoras de ferro (IRP1 e IRP2) (WANG e PANTOPOULOS, 2011). Já em nível sistêmico, a regulação é controlada pela

hepcidina, um peptídeo-hormônio codificado pelo gene *Hamp* (do inglês, *hepcidin antimicrobial peptide*) (EVSTATIEV e GASCHÉ, 2012).

Estudos que relacionam ferro e envelhecimento sugerem que a restrição do consumo desse mineral ou a diminuição da absorção estão diretamente relacionadas à maior expectativa de vida (XU *et al.*, 2010). Observa-se que com o envelhecimento as proteínas que estão associadas ao ferro podem perder essa capacidade, deixando-o livre e, assim, este mineral pode participar da geração de EROs e causar danos oxidativos (DENCHER *et al.*, 2007; DOULIAS *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009), o que poderia acarretar na aceleração do processo do envelhecimento e no desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo.

1.2.4. Antioxidantes

A formação de EROs acontece constantemente em seres vivos e para que o organismo tenha suas funções preservadas, deve haver controle da formação destas espécies, bem como reparo ou degradação das biomoléculas danificadas (HALLIWELL, 2006). As moléculas que desempenham o papel de proteger o organismo contra danos oxidativos são os antioxidantes. Segundo HALLIWELL e GUTTERIDGE (2007), antioxidantes são quaisquer substâncias presentes em baixas concentrações comparadas às concentrações do oxidante que previnem ou retardam a oxidação de substratos. Os antioxidantes podem atuar de maneira direta como sequestradores de radicais, agentes redutores, agentes quelantes de metais ou atuarem na regulação da expressão de genes associados à defesa antioxidante (PISOSCHI e POP, 2015).

Os antioxidantes podem ser sintetizados no organismo ou adquiridos pela dieta (HERMES-LIMA, 2004). O sistema de defesa antioxidante endógeno compreende as enzimas antioxidantes que atuam de maneira coordenada (Figura 3). Dentre as enzimas do sistema de defesa antioxidante endógena, a superóxido dismutase (SOD) apresenta a função de dismutar o $O_2^{\cdot-}$, tornando-o menos reativo, com formação de H_2O_2 . Essa enzima apresenta duas isoformas que estão localizadas em diferentes compartimentos celulares. A SOD citosólica é dependente de zinco e cobre (CuZn-SOD ou SOD1), enquanto a isoforma mitocondrial é dependente de manganês (Mn-SOD ou SOD2) (HERMES-LIMA, 2004). A catalase (CAT) é uma heme-proteína encontrada no citosol, na mitocôndria e nos peroxissomos, responsável principalmente pela remoção de peróxidos inorgânicos do meio intracelular.

A glutationa peroxidase (GPx) é uma enzima que requer quatro átomos de selênio como cofator. Sua função é remover peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos, reação que requer a molécula de glutationa na sua forma reduzida (GSH). Nesta reação a glutationa é oxidada (GSSG) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é removido, com formação de duas moléculas de água (Figura 3). A glutationa é um tripeptídeo formado por glicina, cisteína e ácido glutâmico, e ainda apresenta atividade protetora pela possibilidade de reagir com $\cdot\text{OH}$ em soluções aquosas (HERMES-LIMA, 2004). Para que essa atividade protetora seja mantida, a GSSG precisa ser reduzida a GSH, reação que é catalisada por outra enzima antioxidante, a glutationa redutase (GR). A reação de reciclagem ocorre à custa da conversão de NADPH a NADP^+ . A redução do NADP^+ a NADPH, por sua vez é catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Portanto, a glutationa e NADPH são essenciais para que o estado redox celular seja mantido (HUBER e ALMEIDA, 2008). A GPx e a CAT são importantes na prevenção da reação de Fenton por participarem da eliminação de H_2O_2 , principal substrato para que a reação ocorra.

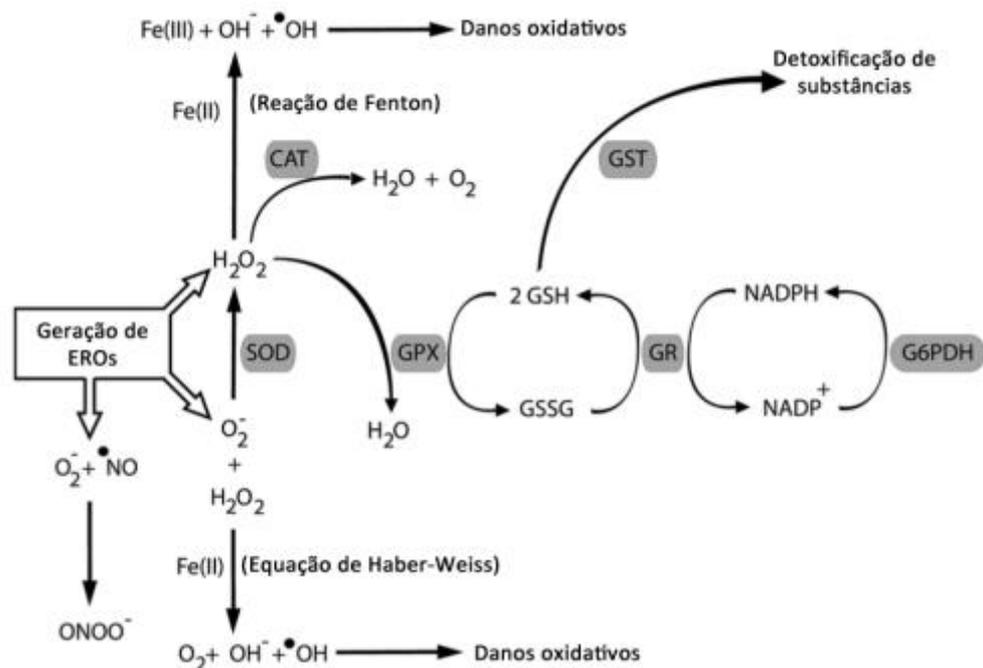


Figura 3. Ação coordenada das enzimas antioxidantes. Fonte: HERMES-LIMA (2004). CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase; GPx, glutaciona peroxidase; GSSG, glutaciona oxidada; GSH, glutaciona reduzida; GR, glutaciona redutase; G6PDH, glicose 6 fosfato desidrogenase; NADP^+ , fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado; NADPH, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; GST, glutaciona S-transferase; ONOO^- , peroxinitrito; $\cdot\text{NO}$, óxido nítrico; $\text{O}_2^{\cdot-}$, radical superóxido; $\cdot\text{OH}$, radical hidroxil; OH^- , íon hidroxila.

A glutathione também está associada ao metabolismo de xenobióticos, compostos exógenos naturais ou não-naturais que podem ser tóxicos ao organismo. A glutathione participa da fase II do metabolismo de xenobióticos, passo chave para a eliminação destes compostos do meio celular. Uma das enzimas envolvidas nesta fase é a glutathione S-transferase (GST), que catalisa a conjugação dos xenobióticos a compostos endógenos, tornando-os mais solúveis em água e protegendo o organismo de compostos tóxicos (HUBER e ALMEIDA, 2008).

Com a ação orquestrada destas enzimas o organismo consegue, em situações de homeostase, minimizar os efeitos causados pelas EROs. Para auxiliar nessa resposta, ainda há atuação dos antioxidantes exógenos, que são obtidos pela dieta. Dentre esses, os principais antioxidantes dietéticos são o ácido ascórbico (vitamina C), encontrado em frutas cítricas, os tocoferóis e tocotrienóis (vitamina E), presentes em grãos, cereais integrais e sementes, e os carotenoides (β -caroteno, licopeno, zeaxantina e luteína), encontrados em folhosos verdes-escuros e vegetais de cores de amarelo a laranja ou vermelho (SIES e STAHL, 1995). A vitamina C age como um importante antioxidante sequestrador e redutor de radicais hidrofílicos, enquanto a vitamina E é um dos mais potentes sequestradores de radicais lipofílicos (LOBO *et al.*, 2010). Similar à vitamina E, os carotenoides também podem atuar como sequestradores de radicais (STAHL e SIES, 2003).

1.2.4.1. Fitoquímicos e atividade antioxidante

Compostos dietéticos, como os compostos fitoquímicos, têm sido apontados como importantes agentes antioxidantes dietéticos, também encontrados em frutas e hortaliças (QUIDEAU *et al.*, 2011; LIU, 2013). Esses compostos são capazes de aumentar a expressão e atividade de enzimas antioxidantes, além de apresentarem funções anti-inflamatória, anti-angiogênica e anti-coagulante e estarem relacionada à modulação de genes relacionados ao envelhecimento (LIU, 2013; PISOSCHI e POP, 2015).

No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconizou o consumo mínimo de 400 g de frutas e hortaliças por dia ou o correspondente a cinco porções, baseada em evidências de que o maior consumo desses alimentos promovia efeito protetor contra doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (WHO, 1990). Estudos mostram que indivíduos que apresentam consumo diário de frutas e hortaliças apresentam menor risco do desenvolvimento de

doenças crônicas, como diminuição do risco de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e do declínio funcional associado à idade (BLOCK *et al.*, 1992; MICHELS *et al.*, 2002; GENKINGER *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2011; HODGE *et al.*, 2014).

Um estudo de coorte realizado em dez países europeus, entre 1992 e 2010, comparou o consumo de vegetais e o risco de morte da população europeia (LEENDERS *et al.*, 2013). Observou-se que o maior consumo de frutas e hortaliças combinados estava inversamente associado a todas as causas de morte; ainda neste estudo, verificou-se que os indivíduos que apresentavam consumo de frutas e hortaliças maior que 569 g apresentavam risco de morte retardado, quando comparado aos indivíduos que ingeriam quantidade menor que 269 g. Similar a esses resultados, outro estudo realizado na Inglaterra mostrou que uma ingestão de frutas e hortaliças maior que sete porções por dia apresentava associação com redução de mortalidade por câncer e doenças cardiovasculares (OYEBODE *et al.*, 2014). Assim, sugere-se que a maior inclusão de frutas e hortaliças nos hábitos alimentares podem reduzir a incidência de doenças crônicas, diminuir ou retardar a mortalidade. A ingestão de diferentes frutas e hortaliças fornece diferentes nutrientes e fitoquímicos, que auxiliam na prevenção de doenças crônicas e na promoção de um envelhecimento saudável (CALABRESE *et al.*, 2010; GIOVANNINI e MASELLA, 2012; HODGE *et al.*, 2014).

Os fitoquímicos são definidos como substâncias químicas bioativas produzidas por vegetais e representam parte do sistema de defesa das plantas em resposta à adaptação de condições ambientais de estresse (QUIDEAU *et al.*, 2011; LIU, 2013). Apesar de serem encontrados em pequenas concentrações nos vegetais, quando ingeridos pelos animais estão associados à prevenção de doenças crônicas (BAUR *et al.*, 2006; CALABRESE *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2014). Já foram identificados mais de 5.000 fitoquímicos que foram isolados de frutas, hortaliças e grãos, sendo classificados como compostos fenólicos, alcaloides, fitoesteróis e carotenoides (QUIDEAU *et al.*, 2011; LIU, 2013).

Na figura 4, pode ser observado um esquema de classificação desses fitoquímicos. Os compostos fenólicos compreendem o maior grupo dentre os fitoquímicos e contêm um ou mais anéis aromáticos associados a um grupo hidroxil em suas estruturas, sendo categorizados como ácidos fenólicos, lignanas, flavonoides, estilbenos e taninos (LIU, 2013). Dentre os alimentos comumente ingeridos, os compostos fitoquímicos são encontrados em frutos como cacau (MILLER *et al.*, 2009), maçã (VRHOVSEK *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2009), uva (PALOMINO *et al.*, 2000; DE ROSSO *et al.*,

2014), frutos típicos do Brasil (SIQUEIRA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014; PAZ *et al.*, 2015), ou em alimentos processados como vinhos e azeite (CARLUCCIO *et al.*, 2003). Entre os alimentos brasileiros, os frutos do cerrado apresentam alto teor de fitoquímicos dentre os quais destaca-se o tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart), com alto potencial antioxidante e alta concentração de compostos fenólicos (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

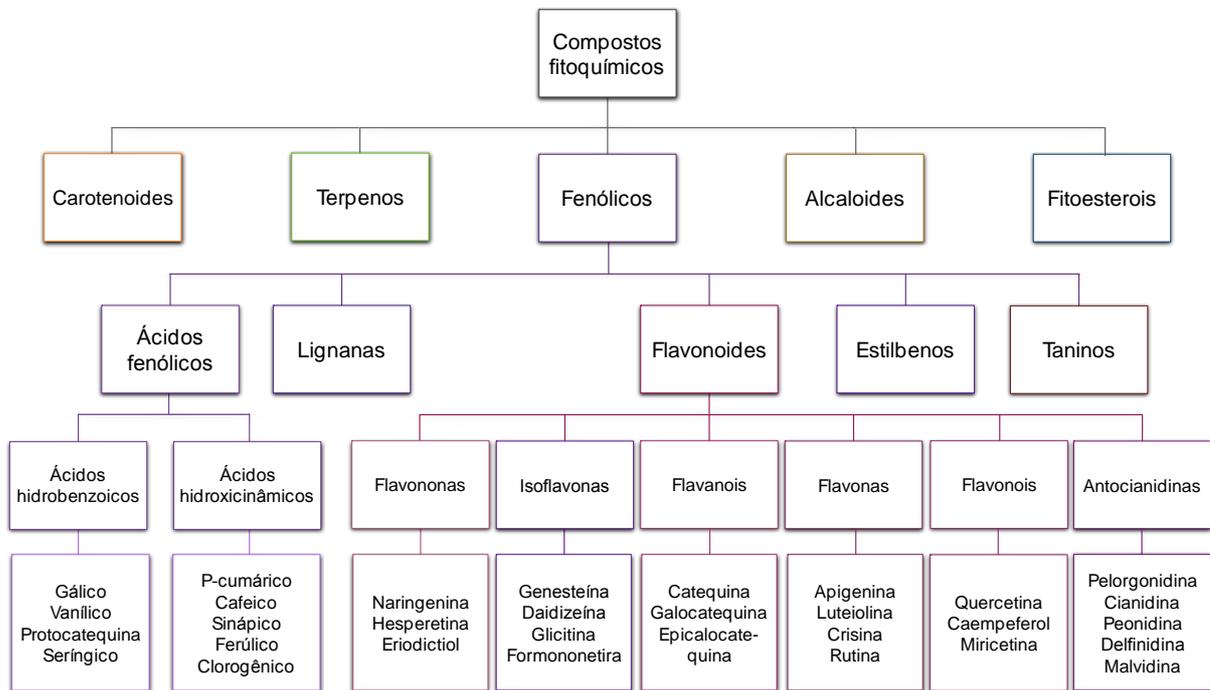


Figura 4. Classes de fitoquímicos. Fonte: adaptado de ROSA (2013).

Os fitoquímicos podem agir como antioxidantes atuando como agentes quelantes de metais (PERRON e BRUMAGHIM, 2009), inibidores de oxidases (como as lipoxigenases, ciclooxigenase e NADPH oxidase) (MURAKAMI e OHIGASHI, 2007), além de estimularem a síntese e atividade de enzimas antioxidantes (RICE-EVANS *et al.*, 1996; SHAH *et al.*, 2014). Essas propriedades promovem efeitos preventivos contra a inflamação, doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (OBRENOVICH *et al.*, 2010; DENIS *et al.*, 2013).

Um estudo realizado com indivíduos com sobrepeso ou obesidade observou que o consumo de dietas ricas em polifenóis, uma classe de fitoquímicos, promovia, no período pós-prandial, diminuição dos níveis de triglicédeos, de lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL) e de 8-

isoprostano urinário, um marcador de estresse oxidativo, evidenciando que dietas ricas em polifenóis podem reduzir marcadores de doenças cardiovasculares e estresse oxidativo (ANNUZZI *et al.*, 2014). SHAH *et al.* (2014) avaliaram o efeito antioxidante do extrato metanólico da planta *Trifolium alexandrinum* contra o estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono (CCl₄; 1 mL/kg de peso) em ratos. A suplementação de extrato de *T. alexandrinum* (200 mg/kg de peso) por duas semanas em ratos com estresse oxidativo promoveu diminuição de marcadores de peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARs) e retornou à atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx no rim aos níveis do grupo controle. Os autores sugeriram que o tratamento com uma fonte de polifenóis apresenta efeitos antioxidantes no organismo de ratos. Dentre os frutos do Cerrado, SIQUEIRA *et al.* (2012) verificaram que o consumo da amêndoa do baru (*Dipteryx alata* Vog.) por ratos suplementados com ferro promoveu redução dos níveis de oxidação de proteínas no fígado, coração e baço destes animais quando comparados aos ratos apenas tratados com suplementação de ferro. Semelhante ao baru, o tucum-do-cerrado apresentou *in vivo* capacidade de proteger o organismo de estresse oxidativo também induzido por ferro (FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016).

Considerando as ações fisiológicas dos fitoquímicos, os efeitos biológicos dessas também foram estudadas na prevenção do envelhecimento e doenças associadas. Em um estudo de coorte prospectiva de 11 anos com a população do Japão, KURIYAMA *et al.* (2006) verificaram que o consumo diário de chá verde apresentou associação à redução de todas as causas de mortalidade em indivíduos idosos. Os autores sugeriram que esse efeito pode estar relacionado à presença de catequinas, os principais polifenóis encontrados no chá verde (KURIYAMA *et al.*, 2006). Similar a esse estudo, ensaios experimentais têm observado que os polifenóis presentes no azeite de oliva, no chá verde e em frutas apresentam efeitos de proteção contra o estresse oxidativo e por isso poderiam também ter um efeito protetor na progressão do envelhecimento (ANGELONI *et al.*, 2008; SRIVIDHYA *et al.*, 2008; CHARLES *et al.*, 2013; COBAN *et al.*, 2014; RASTOGI *et al.*, 2014). CHARLES *et al.* (2013) demonstraram que a administração de polifenóis do vinho (75 mg kg/dia) para ratos desde jovens recupera a capacidade oxidativa da mitocôndria, diminui a produção de EROs e melhora a defesa antioxidante de ratos em idade mais avançada, quando comparados ao grupo controle.

O efeito do resveratrol, polifenol da subclasse dos estilbenos, tem sido o mais extensamente estudado na progressão da senescência celular. A expectativa de vida de levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando cultivada em um meio com 10 mmol/L de resveratrol foi aumentada

em cerca de 70% (HOWITZ *et al.*, 2003); em um estudo com o peixe *Nothobranchius furzeri*, o uso de 120 mg resveratrol / g de ração aumentou a expectativa de vida destes em até 56% (VALENZANO *et al.*, 2006). Esse efeito também já foi observado com outros polifenóis, como a epigallocatequina galato (EGCG), quercetina e antocianinas (PIETSCH *et al.*, 2009). WILSON *et al.* (2006) observaram que o tratamento do nematoide *Caenorhabditis elegans* com a fração de proantocianidinas (200 µg/mL) obtidas a partir de extratos de mirtilo (*Vaccinium angustifolium*) aumentou a expectativa de vida em 20%. Estudos com *Drosophila melanogaster* mostraram que o tratamento destas com dietas ricas em ferro (100 a 1000 µg de ferro/ g de dieta) promovia diminuição da expectativa de vida, entretanto, quando esse tratamento era associado a extratos de chá verde observou-se que o chá preveniu o acúmulo de ferro corporal e promoveu aumento da expectativa de vida. Esses estudos sugeriram que polifenóis presentes no chá são responsáveis pelo efeito inibitório na absorção de ferro (BRUNE *et al.*, 1989; MASSIE *et al.*, 1993) e possivelmente pelo prolongamento da vida. A limitação da absorção e consequente diminuição da sobrecarga de ferro e dos efeitos deletérios causados por este mineral podem estar associadas à modulação da expressão de proteínas do metabolismo de ferro pelos fitoquímicos e/ou ao efeito quelante destes compostos sob o ferro (MOREL *et al.*, 1993; SESTILI *et al.*, 2002; MELIDOU *et al.*, 2005). Estudos com mamíferos apresentam resultados semelhantes em relação à expectativa de vida (BARGER *et al.*, 2008; PEARSON *et al.*, 2008; AIRES *et al.*, 2012). PORQUET *et al.* (2013) observaram em camundongos com senescência geneticamente acelerada (camundongos SAMP8) que a suplementação dietética de resveratrol (1g/ kg de dieta) por sete meses de tratamento aumentou a expectativa de vida média desses animais em 33% em relação ao grupo controle.

Alguns mecanismos que descrevem o papel dos fitoquímicos na prevenção do envelhecimento já foram propostos e envolvem a ação antioxidante e anti-inflamatória destes compostos, estando associados à indução de proteínas e fatores de transcrição como o fator eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e as sirtuínas (AGARWAL e BAUR, 2011; STEFANSON e BAKOVIC, 2014; SIN *et al.*, 2015; SOERENSEN *et al.*, 2015).

1.2.4.2. Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)

O fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) é um fator de transcrição pertencente à família “*cap n' collar leucine zipper*”, expresso amplamente nos tecidos e está associado à resistência

ao estresse oxidativo, controlando a resposta celular adaptativa a vários estressores ambientais (NGUYEN *et al.*, 2009; GORRINI *et al.*, 2013; HAYES e DINKOVA-KOSTOVA, 2014). Este fator de transcrição atua na regulação de mais de 100 genes que codificam enzimas detoxificantes e que atuam no sistema de defesa antioxidante, através de sua ligação a uma região promotora do DNA desses genes, conhecida como “elemento responsivo a antioxidantes” (ARE) (NGUYEN *et al.*, 2009; HAYES e DINKOVA-KOSTOVA, 2014).

Uma das principais funções do Nrf2 é regular a síntese e reciclagem de GSH, por regular a expressão de enzimas limitantes neste processo como a glutamato-cisteína ligase (GCL) e a GR (LEWIS *et al.*, 2010). Em situações de homeostase, a atividade do Nrf2 é mantida em níveis basais, nas quais o Nrf2 permanece ligado a uma proteína repressora, a proteína Keap1 (do inglês, *Kelch-like ECH-associated protein 1*), que complexada a outras proteínas, promove degradação proteossomal do Nrf2 (Figura 5) (CHUN *et al.*, 2014). De modo genérico, em situações de estresse oxidativo ou na presença de indutores da atividade do Nrf2, como compostos fitoquímicos, são desencadeadas cascatas que promovem a fosforilação do Nrf2, a oxidação e modificações covalentes da Keap1. Essas alterações provocam a dissociação do complexo formado entre o Nrf2 e a Keap1 (figura 5). Ao se dissociar da Keap1, o Nrf2 migra para o núcleo e se liga ao ARE presente na região promotora de genes que codificam enzimas citoprotetoras e de seu próprio gene, induzindo a transcrição e aumento da capacidade antioxidante e anti-inflamatória da célula (CHUN *et al.*, 2014; HAYES e DINKOVA-KOSTOVA, 2014).

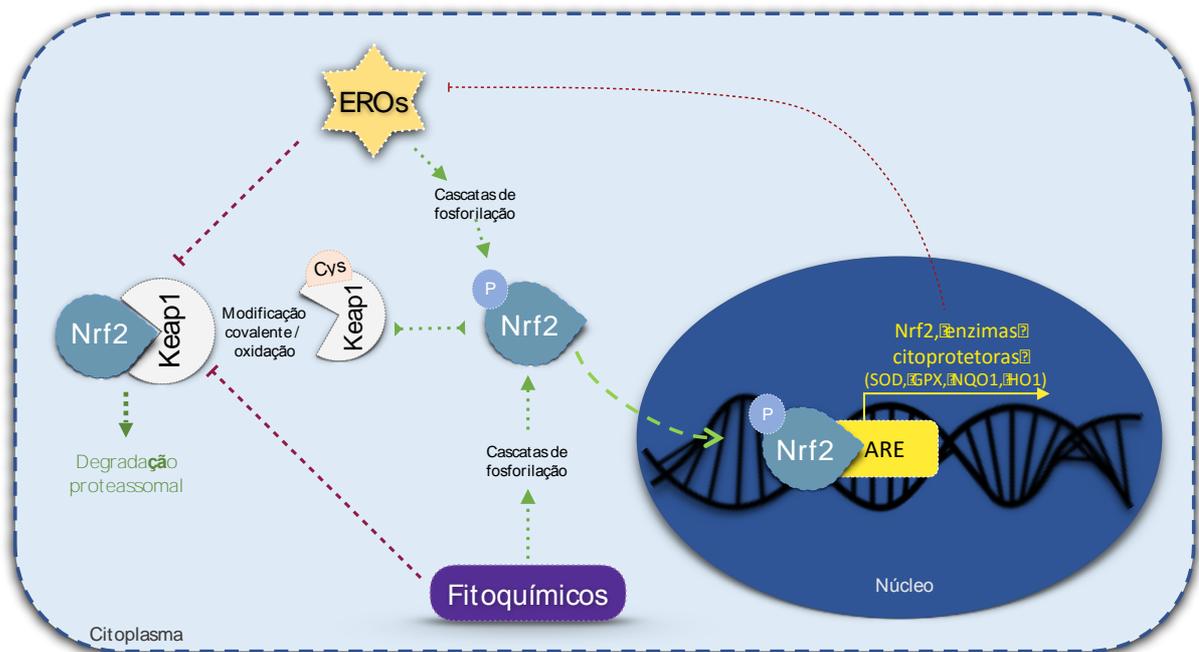


Figura 5. Regulação e ativação do Nrf2 por oxidantes ou fatores dietéticos. Fonte: adaptado de SURH *et al.* (2005). Keap1, Kelch-like proteína associada à ECH 1; Nrf2, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; EROs, espécies reativas de oxigênio; Cys, cisteína; P, fosforilação; ARE, elemento responsivo a antioxidantes; SOD, superóxido dismutase; GPx, glutathione peroxidase; NQO1, NAD(P)H: desidrogenase-(quinona)1; HO1, heme oxigenase-1.

REISMAN *et al.* (2009) demonstraram que camundongos transgênicos que não expressavam Nrf2 (Nrf2^{-/-}) apresentavam níveis diminuídos de mRNA de diversas enzimas antioxidantes, como a SOD, enquanto camundongos geneticamente modificados para expressar menores níveis da proteína Keap1 apresentavam maiores níveis de GSH e GST, indicando a participação do Nrf2 na ativação de enzimas antioxidantes.

Além de mediar a resposta antioxidante, a via relacionada à ativação do Nrf2 parece reduzir a resposta inflamatória por mecanismos que não estão totalmente elucidados. Sugere-se que o Nrf2 diminua a inflamação por inibir a expressão de genes pró-inflamatórios incluindo o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e diminuir os níveis de metabólitos de prostaglandinas e moléculas de adesão celular (KIM *et al.*, 2010). KIM *et al.* (2010) sugeriram que o efeito anti-inflamatório do Nrf2 aconteça pela limitação da ativação do NF κ B, uma vez que os genes regulados pelo Nrf2 contribuem para diminuição dos níveis de RL, que são ativadores do NF κ B. THIMMULAPPA *et al.* (2006) observaram que camundongos *knockout* para Nrf2 (Nrf2^{-/-}) apresentavam menores níveis basais de mRNA de GPx e de sua atividade no pulmão, comparados aos camundongos selvagens. Quando os animais Nrf2^{-/-} foram tratados com o lipopolissacarídeo (LPS; 10 μ g / kg de peso), indutor da inflamação, foi observada maior ativação do

NFκB no pulmão, maior secreção de TNF-α e menores níveis de GSH, indicando que a presença de Nrf2 é necessária para que as defesas antioxidantes celulares possam combater a inflamação, limitando os níveis de EROs.

Compostos fitoquímicos como os sulforafanos presentes nos brócolis; as saponinas, encontradas no *ginseng*; o resveratrol, a quercetina, a miricetina e o ácido elágico, presentes em frutas vermelhas e a curcumina, presente no açafrão podem ativar a resposta mediada por Nrf2, protegendo o organismo do estresse oxidativo (THOPPIL *et al.*, 2012; CHUN *et al.*, 2014; QIN e HOU, 2016). THOPPIL *et al.* (2012) observaram, em um modelo de hepatocarcinogênese induzida por estresse oxidativo, que o tratamento prévio dos animais com extrato da casca de groselha negra (100 e 500 mg/Kg de peso) promovia diminuição da peroxidação lipídica, aumento dos níveis de mRNA de Nrf2, aumento da expressão de enzimas antioxidantes e detoxificantes como a NAD(P)H: desidrogenase-(quinona)1 (NQO1) e GST. Os autores sugeriram que a utilização do extrato da casca de groselha negra, rico em antocianinas, atenua o estresse oxidativo através da ativação de Nrf2. DENIS *et al.* (2015) verificaram que a pré-incubação de células de câncer de cólon (Caco-2) com extrato de polifenóis de arando (200 µg/mL de meio), um fruto rico em ácidos fenólicos, antocianinas, flavonóis e procianidinas, protegeu essas células de danos oxidativos induzidos por incubação com ascorbato de ferro (Fe/Asc; 200 mM/2 mM), diminuindo os níveis de peroxidação lipídica e de marcadores de inflamação (prostaglandina E2, cicloxigenase-2, TNF-α, IL-6 e NFκB) e aumentando os níveis de Nrf2 nuclear e da atividade de CAT. Esses resultados indicam que o consumo de frutos ricos em fitoquímicos podem ter efeito citoprotetor, diminuindo danos oxidativos e inflamatórios, efeitos que podem ser mediados por Nrf2.

O fato do Nrf2 induzir a expressão de moléculas citoprotetoras, como as enzimas antioxidantes, sugere que o Nrf2 desempenhe importante função no processo do envelhecimento (LEWIS *et al.*, 2010). SHIH e YEN (2007) observaram em um estudo com ratos jovens (2 meses, 200-250g), ratos meia idade (1 ano, 400-600 g) e ratos idosos (2 anos, 650-750 g) que com o aumento da idade há decréscimo dos níveis de mRNA e da atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e GR, bem como aumento dos níveis de marcadores de oxidação de proteína e lipídios. Ao investigarem se a diminuição da capacidade antioxidante dos animais idosos estava associada aos níveis de Nrf2, foi verificado que com o aumento da idade havia diminuição dos níveis de Nrf2, sugerindo então que o

envelhecimento poderia estar associado à menor resistência ao estresse oxidativo pela redução da ativação da via modulada pelo Nrf2.

LI *et al.* (2014) investigaram o efeito da classe de fitoquímicos saponinas da planta *Aralia taibaiensis*, uma planta chinesa, em um modelo animal de envelhecimento induzido por D-galactose. Os animais que receberam apenas a dose de D-galactose (150 mg / kg de peso) apresentaram maiores níveis de malondialdeído (MDA) e redução da atividade enzimática de SOD, GR e CAT no soro e no fígado, comparados ao grupo controle. Entretanto, quando houve administração concomitante de D-galactose e extrato de saponinas da *Aralia taibaiensis* (200 mg/kg de peso) os danos oxidativos foram atenuados, com diminuição dos níveis de MDA, maior capacidade antioxidante, avaliada pelo aumento da atividade enzimática de SOD, GR e CAT no soro e no fígado, e maiores níveis de Nrf2 no fígado comparados ao grupo tratado apenas com D-galactose. Portanto, os autores sugeriram que o aumento da atividade antioxidante dessas enzimas estaria em parte associado à ativação do Nrf2 pelas saponinas, contribuindo para atenuar o envelhecimento induzido por D-galactose.

1.2.5. Marcadores de envelhecimento

O processo de envelhecimento tem sido associado à alteração da expressão e/ou atividade de algumas proteínas, sendo, portanto, essas consideradas marcadores de envelhecimento, como as sirtuínas e a proteína marcadora da senescência 30 (SMP30), que apresentam associação com o estado oxidativo e inflamatório do organismo (SON *et al.*, 2006; KONDO *et al.*, 2014; THOMPSON *et al.*, 2014).

1.2.5.1. Sirtuínas

As sirtuínas pertencem a uma classe de proteínas desacetilases ou mono-ADP-ribosiltransferases presentes desde organismos inferiores, como leveduras, até organismos superiores, como humanos (BRACHMANN *et al.*, 1995). Essa classe de proteínas foi primeiramente identificada em leveduras, nas quais foram chamadas de proteínas silenciadoras reguladoras de informação 2 (Sir2, *silent information regulator 2*), participando da modificação pós-traducional de algumas proteínas histonas e não-histonas (VIJG *et al.*, 2008).

Os primeiros estudos mostraram que na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a atividade de histona desacetilase (HDAC) promovia aumento da compactação da cromatina, diminuição da transcrição no locus de acasalamento (MAT, *mating-type*) das regiões teloméricas e do DNA ribossômico (rDNA) (KAEBERLEIN *et al.*, 1999). KAEBERLEIN *et al.* (1999) verificaram que a Sir2 é um componente limitante na promoção da longevidade de leveduras, uma vez que a introdução de uma segunda cópia de Sir2 no genoma destas leveduras aumentou em cerca de 30% a expectativa de vida quando comparada à levedura selvagem. Em um outro estudo com nematoide *Caenorhabditis elegans* verificou-se que a superexpressão de Sir2 aumentava a longevidade de 10 a 15% destes organismos (TISSENBAUM e GUARENTE, 2001).

Em mamíferos existem sete genes homólogos da Sir2, as sirtuínas (SIRT), que são reguladores metabólicos, e que se diferem de acordo com a expressão em tecidos, localização subcelular, atividade enzimática e alvo dessa atividade (PIRINEN *et al.*, 2012; DUAN, 2013; GIBLIN *et al.*, 2014). A localização celular da SIRT1 pode variar entre o núcleo e o citosol dependendo do tipo celular e de fatores microambientais, sendo predominantemente encontrada no núcleo (MICHISHITA *et al.*, 2005; PIRINEN *et al.*, 2012). A SIRT2 é predominantemente citosólica, enquanto as SIRT3, SIRT4 e SIRT5 são consideradas mitocondriais e as SIRT6 e SIRT7 são encontradas no núcleo, localizadas na heterocromatina e no nucléolo, respectivamente (MICHISHITA *et al.*, 2005; PIRINEN *et al.*, 2012; DUAN, 2013; GIBLIN *et al.*, 2014).

Além das funções de desacetilases e de mono-ADP-ribosiltransferases as sirtuínas estão envolvidas ainda em vias de resposta ao estresse celular (HAIGIS *et al.*, 2006), que podem estar associadas ao processo biológico de envelhecimento. Como desacetilases, as sirtuínas atuam removendo grupos acetil de resíduos de lisina de variadas classes de proteínas, incluindo histonas, fatores de transcrição e proteínas do reparo de DNA (RAHMAN e ISLAM, 2011), ativando ou inibindo a expressão e atividade destas proteínas. A atividade de desacetilação ocorre com consumo da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD⁺) e com formação de nicotinamida (NAM) e O-acetil-ADP ribose como produtos (CANTO *et al.*, 2013).

As sirtuínas apresentam papel importante na resposta ao estresse oxidativo por desacetilar diversos fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na reposta antioxidante, como o *Forkhead box O* (FOXO)3, que induz a expressão de SOD2 e o co-ativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α), que induz a expressão de GPx, CAT e SOD1. Na

mitocôndria, as sirtuínas desacetilam e aumentam a atividade de SOD2 e de isocitrato desidrogenase (IDH2), esta última associada à conversão de NADP⁺ a NADPH, essencial para manter os níveis de GSH. Por outro lado, as sirtuínas desacetilam uma subunidade do NFκB tornando-o inativo, com consequentemente diminuição da resposta inflamatória (Figura 6) (MERKSAMER *et al.*, 2013). Além disso, embora não haja consenso, alguns estudos recentes sugerem que pode haver interação entre a atividade de sirtuínas e a ativação de Nrf2, que geram repostas sinérgicas a fim de promover maior resistência ao estresse oxidativo (HUANG *et al.*, 2015; LI, S. *et al.*, 2016).



Figura 6. Regulação da resposta antioxidante pelas sirtuínas. Fonte: MERKSAMER *et al.* (2013) – adaptado. Setas indicam regulação positiva, enquanto barras indicam regulação negativa. Linhas sólidas indicam forte evidências experimentais; linhas tracejadas indicam possíveis interações. NFκB, fator nuclear kappa B; FOXO3, *forkhead box O3*; SOD, superóxido dismutase.

Os mecanismos de regulação da expressão e atividade das SIRTs ainda não estão elucidados, entretanto evidencia-se regulação em nível transcricional, modificação pós-traducional e regulação da própria atividade pela concentração de substrato ou presença de compostos dietéticos (MILNE e DENU, 2008; HOUTKOOPE *et al.*, 2012).

Para exemplificar os mecanismos de regulação, assume-se a SIRT1 como modelo, por constituir a sirtuína mais estudada. O gene que codifica a proteína SIRT1 (*Sirt1*) apresenta sítio de ligação em seu promotor para diversas proteínas e fatores de transcrição. Dentre os fatores de transcrição descritos como ativadores da transcrição de *Sirt1*, destacam-se o fator de transcrição *forkhead box protein O3a* (FOXO3a), a proteína de ligação do elemento responsivo a AMP cíclico (CREBP), e os receptores ativadores de proliferação de peroxissoma (PPAR) α e (PPAR) δ . Os repressores descritos são a proteína de ligação do elemento responsivo a carboidratos (ChREBP), o PPAR γ , e a enzima Poli (ADP-ribose) polimerase 2 (PARP2), esta última envolvida no reparo do DNA (HOUTKOOPE *et al.*, 2012).

Um mecanismo proposto para explicar a indução da transcrição de *Sirt1* envolve situações de restrição calórica, jejum ou na prática de exercícios físicos. Nessas condições a razão insulina/glucagon diminui, há aumento dos níveis de AMP cíclico (cAMP) e consequente ativação de CREBP, que então promove a ativação de SIRT1 (NORIEGA *et al.*, 2011). Durante o período de privação de energia há ainda aumento dos níveis intracelulares de NAD⁺, que induziria a expressão de PPAR α e PPAR δ , que por sua vez aumentariam a expressão de *Sirt1* (HAYASHIDA *et al.*, 2010; OKAZAKI *et al.*, 2010). A inibição da transcrição de *Sirt1* por ChREBP está relacionada à disponibilidade de nutrientes, situação na qual a ChREBP é importada para o núcleo enquanto a CREBP é exportada do núcleo, favorecendo a ligação de ChREBP ao promotor para promover a inibição da transcrição de *Sirt1* (NORIEGA *et al.*, 2011). Durante o processo de progressão do envelhecimento a inibição da transcrição de *Sirt1* por PPAR γ parece prevalecer em relação aos outros mecanismos de inibição de SIRT1, visto que a atividade do PPAR γ está aumentada no envelhecimento celular (GAN *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2010).

Apesar dos mecanismos de modificação pós-traducionais também serem pouco descritos, já foi observado que a SIRT1 apresenta sítios-alvo de fosforilação (YANG, Y. *et al.*, 2007; NASRIN *et al.*, 2009; HOUTKOOPE *et al.*, 2012). Células renais embrionárias humanas (HEK293T) incubadas com anisomicina (10 μ g/mL), ativador de quinase c-Jun-N-terminal (JNK), apresentaram aumento da fosforilação e maior atividade de SIRT1, indicando que a fosforilação de determinados resíduos de SIRT1 pode induzir sua atividade (NASRIN *et al.*, 2009).

Com relação aos substratos, observa-se que quando a razão NAD⁺/NADH está aumentada, há maior atividade de SIRT1, como no caso de situações de jejum, restrição calórica e exercício físico.

Contrariamente, quando a razão NAD⁺/NADH encontra-se diminuída, a atividade de SIRT1 diminui (HOUTKOOOPER *et al.*, 2012). A concentração de NAD⁺ pode ser influenciada pela atividade de outras enzimas que o utilizam para desempenhar suas funções, como as PARPs, que catalisam a transferência de ADP-ribose do NAD⁺ para uma proteína, a fim de reparar o DNA (HOUTKOOOPER *et al.*, 2012). A PARP1 parece inibir SIRT1 por competir por NAD⁺, uma vez que a deleção do gene *Parp1* promove aumento dos níveis intracelulares de NAD⁺ e ativa a SIRT1 (BAI, CANTO, OUDART, *et al.*, 2011). A PARP2 liga-se ao promotor de SIRT1 e inibe a transcrição, e observa-se que a deleção do gene *Parp2* promove aumento da atividade de SIRT1 (BAI, CANTO, BRUNYANSZKI, *et al.*, 2011). Durante o envelhecimento observa-se maiores níveis de peroxidação lipídica, de proteína carbonilada, e forte correlação positiva entre dano ao DNA, menor atividade de SIRT1 e depleção de NAD⁺, sugerindo que a concentração de NAD⁺ e a atividade de SIRT1 podem ser importantes fatores para a longevidade (BRAIDY *et al.*, 2011).

Compostos dietéticos também são capazes de regular a expressão e atividade das SIRTs por mecanismos ainda desconhecidos (MILNE e DENU, 2008). Dentre os fitoquímicos, o resveratrol é o composto que mais tem sido relacionado à expressão e atividade de SIRT1. Sugere-se que os fitoquímicos possam agir diretamente, induzindo tanto a transcrição quanto a atividade das sirtuínas, ou por diminuir o valor de K_m , aumentando a afinidade pelo NAD⁺ ou os níveis de proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que por sua vez aumentaria os níveis e atividade de SIRT (HOUTKOOOPER *et al.*, 2012).

1.2.5.1.1. Sirtuína 1 (SIRT1)

A sirtuína 1 (SIRT1) é a proteína da família das SIRTs mais estudada e está envolvida na regulação da transcrição, incluindo a desacetilação da histona-3-lisina-9 (H3-K9), histona-4-lisina-16 (H4-K16) e histona-1-lisina-26 (H1-K26), e outras proteínas não-histona como alvo, como a p53, o fator de transcrição *forkhead box protein O1/3* (FOXO1/3), o co-ativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α) e o fator nuclear *kappa-B* (NF κ B) (HUBBARD e SINCLAIR, 2014).

A literatura descreve que a SIRT1 regula a inflamação no tecido adiposo e no fígado, pela inibição da via de sinalização do NF κ B. Um estudo *in vivo* evidenciou que a superexpressão de Sirt1

protegeu camundongos do desenvolvimento de esteatose hepática induzida por dieta com alto teor de lipídios, através da inibição da inativação do NFκB e conseqüentemente da inflamação (PFLUGER *et al.*, 2008). Observações similares foram observadas por PURUSHOTHAM *et al.* (2009), que revelaram que a superexpressão de *Sirt1* no fígado foi capaz de induzir a expressão de PPARα, ativar o PGC-1α, induzindo a oxidação de lipídios e inibindo a sinalização do NFκB.

A presença de EROs pode diminuir os níveis de mRNA, de proteína e também a atividade de SIRT1 (CAITO *et al.*, 2010; YUAN *et al.*, 2016). FURUKAWA *et al.* (2007) ao estudar o papel de SIRT1 na senescência celular induzida por estresse oxidativo, verificaram que em fibroblastos humanos (células TIG-3) tratados com peróxido de hidrogênio (50 μmol/L) houve depleção de NAD⁺ e diminuição da atividade de SIRT1 e maiores níveis de um marcador de senescência celular (*senescence associated-β-galactosidase*; SA-β gal). Nessa mesma perspectiva, estudos com moléculas ativadoras de SIRT1 mostram diminuição de níveis de danos oxidativos (FRANCO *et al.*, 2010; YUN *et al.*, 2012) e inibição da sinalização do NFκB, suprimindo a inflamação (RAJENDRASOZHAN *et al.*, 2008). Descreve-se um papel protetor da SIRT1 com relação à inflamação, uma vez que essa proteína aumenta a expressão de enzimas do sistema antioxidante, como SOD2 e CAT (MOTTA *et al.*, 2004; ST-PIERRE *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2014), indicando que a ativação de SIRT1 promoveria efeitos benéficos em relação a danos oxidativos, inflamação e conseqüentemente o envelhecimento.

Um estudo recente realizado por DAS *et al.* (2016) em um modelo de camundongos com sobrecarga de ferro verificou que nesta situação havia diminuição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), aumento de glutathiona oxidada (GSSG), maiores dos níveis de MDA, das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-α e IL-6 e menor expressão da proteína SIRT1 no fígado destes animais. Entretanto, no grupo com sobrecarga de ferro tratado com resveratrol houve diminuição dos danos oxidativos, com aumento de GSH, redução da peroxidação lipídica e retorno da expressão da proteína SIRT1 aos níveis do grupo placebo. Os autores sugeriram que o resveratrol pode ter efeitos terapêuticos na sobrecarga de ferro, mecanismo que pode estar relacionado ao aumento da expressão e atividade de SIRT1.

Com relação ao envelhecimento, alguns estudos com mamíferos foram conduzidos no intuito de observar a influência dessa proteína na expectativa de vida de roedores (PALACIOS *et al.*, 2010; GIBLIN *et al.*, 2014). PALACIOS *et al.* (2010) verificaram que a SIRT1 parece estar envolvida na

estabilidade de telômeros, estrutura composta por DNA e proteína encontrados nas extremidades dos cromossomos lineares, conferindo proteção à degradação e estabilização da cromatina. Nesse estudo (PALACIOS *et al.*, 2010), camundongos que superexpressavam SIRT1 apresentaram telômeros maiores quando comparados a camundongos selvagem. Outros estudos *in vivo* também corroboram com o papel da SIRT1 na proteção de danos relacionados ao envelhecimento, evidenciando que a superexpressão de SIRT1 está inversamente correlacionada a algumas doenças relacionadas à idade, como a resistência à insulina, a síndrome metabólica e a osteoporose, apesar de não apresentarem aumento na expectativa de vida (PFLUGER *et al.*, 2008; HERRANZ *et al.*, 2010).

Em um estudo com células de músculo liso vascular humanas (VSFMC) de doadores de diferentes faixas etárias (de 12 a 81 anos), THOMPSON *et al.* (2014) observaram que há diminuição significativa da expressão da proteína SIRT1 nestas células com o aumento da idade. Nesse mesmo estudo, a fim de verificar se a redução de SIRT1 relacionada à idade correlacionava-se com a indução da senescência celular, células VSFMC de doadores jovens foram transfectadas com pequenos RNA de interferência (siRNA) de SIRT1 a fim de silenciar esta proteína; observou-se então que o silenciamento de SIRT1 promoveu aumento de SA- β gal. Esses resultados sugeriram que a senescência celular está relacionada à diminuição da expressão de SIRT1, o qual pode estar relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares com o aumento da idade.

BAYRAM *et al.* (2012) observaram que camundongos com senescência avançada, tratados por quatro meses e meio com uma dieta composta por polifenóis extraídos do azeite de oliva, apresentaram menores danos oxidativos, maiores níveis de mRNA de enzimas antioxidantes (GST, NQO1, γ -GCS), de SIRT1 e de Nrf2 no coração, comparados a animais tratados com dieta com baixo teor de polifenóis. Os autores sugeriram que o consumo de azeite de oliva poderia atenuar os efeitos do envelhecimento e que esse efeito benéfico estaria associado à presença dos polifenóis.

NIU *et al.* (2013) investigaram os efeitos do consumo a longo prazo do composto bioativo epigallocatequina galato (EGCG), principal polifenol presente no chá verde, no crescimento e expectativa de vida de ratos saudáveis. O consumo de 25 mg/kg/dia de EGCG retardou a morte em 8 a 12 semanas; diminuiu os danos oxidativos promovidos pelo aumento da idade, evidenciados pela diminuição dos níveis de malondialdeído; reduziu os níveis séricos de TNF- α e IL-6 e aumentou os níveis das enzimas SOD e GPx no fígado e no rim, comparados ao grupo controle. Também foi observado que o consumo de EGCG diminuiu os níveis de mRNA e proteína de NF- κ B, enquanto

aumentou os níveis de mRNA e proteína SIRT1 e FOXO3, no fígado e no rim, comparados ao grupo controle. Os autores sugeriram que o consumo de EGCG poderia aumentar a expectativa de vida provavelmente por prevenir a inflamação e o estresse oxidativo.

Outro estudo *in vitro* com células de pulmão de camundongos senescentes evidenciou que o tratamento com oligonol, um polifenol presente em lichia e sementes de uva, promoveu atenuação da geração de EROs e aumento dos níveis da proteína SIRT1 e ativação da via SIRT1-AMPK (PARK *et al.*, 2016). Os autores sugeriram que a ativação desta via poderia aumentar a autofagia, mecanismo que se encontra diminuído com a idade e, desse modo, retardar o envelhecimento (PARK *et al.*, 2016).

1.2.5.1.2. SIRT3

A sirtuína 3 (SIRT3) é a proteína mitocondrial da classe das sirtuínas melhor caracterizada, constituindo a principal proteína com atividade desacetilase nesta organela (WU *et al.*, 2014; ANSARI *et al.*, 2017). A expressão de SIRT3 é maior em tecidos como cérebro, coração, fígado, rim, músculo esquelético e tecido adiposo (ANSARI *et al.*, 2017). A deleção dessa proteína não causa alterações fenotípicas, mas promove maior probabilidade de desenvolvimento de doenças associadas à idade, como a falência cardíaca e a síndrome metabólica (HIRSCHEY *et al.*, 2011).

Semelhante à SIRT1, a expressão de SIRT3 é diminuída com o aumento da idade e em adultos sedentários (LANZA *et al.*, 2008; ANSARI *et al.*, 2017) e pode ter atividade comprometida quando há baixos níveis de NAD⁺ (YANG, H. *et al.*, 2007; BRAIDY *et al.*, 2011). Embora existam menos evidências, a atividade e expressão SIRT3 podem ser estimuladas por compostos dietéticos (ZHOU *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2016).

Estudos experimentais mostram que a SIRT3 está relacionada à defesa antioxidante na mitocôndria. Camundongos *knockout* para SIRT3 apresentam peroxidação lipídica aumentada e maiores concentrações de proteínas carboniladas, dois marcadores biológicos de estresse oxidativo (SOMEYA *et al.*, 2010). Em outro estudo, TAO *et al.* (2010) demonstraram que camundongos *knockout* para SIRT3 apresentavam menor atividade da enzima manganês-superoxido dismutase (MnSOD ou SOD2). Esses animais apresentavam ainda maiores níveis da enzima MnSOD com resíduos de lisina acetilados comparados aos animais selvagem. QIU *et al.* (2010), por sua vez, observaram que camundongos *knockout* para SIRT3 apresentavam maiores danos oxidativos e menor tempo de vida.

Os autores destes estudos sugeriram que a SIRT3 atue na desacetilação de dois sítios catalíticos de SOD2, que por sua vez reduz os níveis de EROs, promovendo resistência ao estresse oxidativo.

Em células renais embrionárias humanas (HEK293T) tratadas com menadiona e H₂O₂ (25 µmol/L e 1mmol/L, respectivamente) apresentaram diminuição expressiva nos níveis da proteína SIRT3, o que acarretou na acetilação de diversas proteínas-alvo de SIRT3 (YU *et al.*, 2012). Outro estudo evidenciou que a exposição de cardiomiócitos a H₂O₂ (50 µmol/L) reduziu os níveis de SIRT3, ativou NFκB e aumentou a morte destas células (CHEN *et al.*, 2013). ZENG *et al.* (2014) observaram em um modelo de envelhecimento induzido por D-galactose (500 mg/kg de peso) que há diminuição dos níveis de mRNA, proteína e atividade de SOD2 e SIRT3 no córtex auditivo e concomitante maiores níveis de MDA. Desse modo, o decréscimo de SIRT3 diminuiria a capacidade de proteção celular contra danos oxidativos, potencializando a progressão do envelhecimento.

Similar à SIRT1, alguns compostos fitoquímicos também podem induzir a expressão e atividade de SIRT3 (ZHAO *et al.*, 2016; FU *et al.*, 2017). LUO *et al.* (2015) observaram que ratos com 18 meses de idade, tratados previamente a longo prazo (90 dias) com extrato de *ginseng* (80 mg /kg peso/ dia), uma planta rica em fitoquímicos, apresentaram menores danos oxidativos, supressão de sinais apoptóticos, além de maiores níveis de SIRT1 e SIRT3 após a indução de isquemia cardíaca, comparados aos animais não tratados. Outro estudo recente evidenciou que ratos com hiperglicemia tratados com alho por via oral (250 mg/ kg peso / dia), por quatro dias, apresentaram diminuição de EROs, maior atividade de enzimas antioxidantes e maior expressão e atividade SIRT3 no tecido cardíaco (SULTANA *et al.*, 2016). Os autores de ambos estudos sugeriram, então, que o consumo de alho e *ginseng* pode ter efeito benéfico na prevenção de doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento, efeito que estaria associado à ativação de SIRT1 e SIRT3.

1.2.5.2. Proteína marcadora de senescência 30 (SMP30)

A proteína marcadora da senescência 30 (SMP30) é considerada um biomarcador fidedigno do envelhecimento por apresentar diminuição da sua expressão com o aumento da idade (FUJITA *et al.*, 1999; FENG *et al.*, 2004). Sua denominação, *senescence marker protein-30*, decorre do peso molecular próximo a 30 kDa e do fato de diminuir com o envelhecimento. Essa proteína é altamente conservada entre as espécies animais e apresenta cerca de 88% de homologia entre humanos e

roedores (FUJITA *et al.*, 1999). Pode ser encontrada em diferentes tecidos como fígado, rim, coração, pulmão, estômago, testículos, ovário, glândula adrenal e epiderme, mas é predominantemente expressa no fígado e rim (FENG *et al.*, 2004).

Dentre as funções da SMP30, sugere-se que participe da homeostase do cálcio intracelular, sendo também conhecida como regucalcina (FUJITA *et al.*, 1999; YAMAGUCHI, 2005), atuando na ativação da enzima ATPase de cálcio e magnésio, envolvida na regulação da bomba de cálcio da membrana plasmática (FUJITA *et al.*, 1998; YAMAGUCHI, 2005). Outros estudos sugerem participação no metabolismo de lipídios, uma vez que a deficiência da SMP30 provoca acúmulo de lipídios no fígado e diminui a expectativa de vida de camundongos (ISHIGAMI *et al.*, 2004), e ainda causa hiperlipidemia, com aumento de triglicerídeos e ácidos graxos livres (YAMAGUCHI *et al.*, 2004). A SMP30 também está relacionada à produção de vitamina C em roedores, uma vez que foi descrita homologia desta proteína à gluconolactonase (KONDO *et al.*, 2006), porém humanos não são capazes de sintetizar vitamina C. Sugere-se que em roedores, com a diminuição dos níveis de SMP30 há menor síntese de vitamina C, que é um antioxidante, promovendo aumento dos níveis espécies reativas e acelerando o envelhecimento (PARK *et al.*, 2010; AMANO *et al.*, 2013).

Alguns autores sugeriram a existência de uma relação da SMP30 com o estresse oxidativo (HANDA *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2014; KONDO *et al.*, 2014). Observa-se que a diminuição da expressão de SMP30 correlaciona-se com o aumento de danos oxidativos (SON *et al.*, 2006; JUNG *et al.*, 2014; KONDO *et al.*, 2014), enquanto seu aumento provoca diminuição da formação de espécies reativas (HANDA *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2014). SON *et al.* (2006) observaram que camundongos *knockout* para SMP30 apresentavam níveis elevados de espécies reativas, de oxidação de proteínas e maior atividade da enzima NADPH oxidase no cérebro. HANDA *et al.* (2009), por outro lado, verificaram que células de hepatoma humano (células HepG2) que superexpressavam SMP30 apresentaram diminuição da formação de EROs, associada à diminuição da peroxidação lipídica e da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx.

JUNG *et al.* (2014) demonstraram que a SMP30 apresenta relação com a inflamação e estresse oxidativo. Neste estudo foi observado em modelo animal que a administração do estressor 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) em diferentes concentrações (50, 100 ou 200 mg/Kg de peso) resultou na diminuição dos níveis da proteína SMP30, e aumento da produção de espécies reativas, em ratos de seis meses de idade. Em outra série de experimentos com ratos que

não expressavam SMP30 verificou-se maiores níveis de EROs, menores níveis de glutathiona reduzida (GSH), maiores níveis de MDA no rim e diminuição da expectativa de vida destes animais comparados a ratos selvagens. Esses animais apresentaram ainda maior ativação do NFκB e níveis aumentados de genes responsivos ao NFκB, como óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX-2), ambos marcadores de inflamação. Experimentos *in vitro* mostraram que a superexpressão de SMP30 protegeu células epiteliais YPEN-1 do estresse oxidativo induzido por AAPH (200 μmol/L), com diminuição da formação de espécies reativas e de MDA, e menor indício de inflamação, por diminuir a ativação de NFκB. Os autores, ao final, sugeriram que a diminuição de SMP30 pode estar relacionada ao estresse oxidativo e inflamação com a idade e, por isso, pode ser uma molécula alvo de futuros estudos por parecer ter ação antioxidante e anti-inflamatória.

1.2.6. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart)

O Cerrado é um bioma do Brasil que cobre cerca de 204 milhões de hectares de todo o território brasileiro, compreendendo mais de 10.000 espécies de plantas em sua vegetação (MYERS *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2001). Neste bioma há um enorme número de frutas exóticas nativas ainda não estudadas, mas que tem despertado interesse por apresentarem características de elevada concentração de vitaminas e minerais, de alto potencial antioxidante e serem ricas em fitoquímicos (MARIN *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2013; DE SOUZA *et al.*, 2014). Os frutos do Cerrado são consumidos pela população na forma de doces, bolos, sucos, licores, geleias e sorvetes, com grande aceitação por parte da população (DA SILVA *et al.*, 2001).

O tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) é um fruto produzido por palmeiras de 4 a 6 metros de altura. Popularmente é conhecido como tucum, tucum-do-brejo e uva-do-brejo. O período de frutificação vai de janeiro a março e quando maduro apresenta casca e polpa de cor violeta (figura 6) e pode ser consumido *in natura*, sob forma de sucos, sorvetes, geleias, vinhos ou vinagre (DA SILVA *et al.*, 2001). Em termos nutricionais, o tucum-do-cerrado apresenta em sua composição maior teor de carboidratos (18,7 g/ 100 g), seguido de fibras (1,7 g/ 100 g) e proteínas (1,2 g/ 100 mg) e baixo teor de lipídios (0,14 g/ 100 g) (FUSTINONI, 2013). Em relação a micronutrientes este fruto contém: 1,4 g de ferro / 100 mg, 78,4 mg de vitamina C / 100 g (FUSTINONI, 2013; ROSA, 2013).



Figura 6. Tucum-do-cerrado coletado em março de 2013, em Terezópolis de Goiás, GO, Brasil. (Fonte: Arquivo pessoal)

Um estudo do nosso grupo (SIQUEIRA *et al.*, 2013) avaliou o potencial antioxidante *in vitro* e a composição de fitoquímicos de doze frutos do cerrado (araticum, baru, cagaita, cajuzinho, guariroba, ingá, jatobá, jenipapo, jurubeba, lobeira, mangaba e tucum-do-cerrado). Nove dos doze frutos examinados (araticum, cagaita, cajuzinho, ingá, jenipapo, jurubeba, lobeira, mangaba e o tucum-do-cerrado) apresentaram alto teor de compostos antioxidantes e fitoquímicos quando comparados à maçã, uma fruta conhecida por ser rica nestes compostos.

No estudo realizado por ROSA *et al.* (2016), foi observado que o tucum-do-cerrado é um fruto rico em compostos fenólicos, sendo encontrados principalmente na casca do fruto, parte comestível do fruto. No mesmo estudo, foram identificados em diferentes extratos da casca do tucum-do-cerrado ácidos fenólicos, estilbenos e flavonoides, esta última classe em maior concentração. Nesses extratos, dentre a classe de ácidos fenólicos, foi detectada a subclasse de ácidos hidrobenzoicos, enquanto da subclasse de flavonoides foi identificado flavanois, flavonas e antocianinas.

Completando os estudos de SIQUEIRA *et al.* (2013) e ROSA *et al.* (2016), outros dois estudos avaliaram os efeitos do tucum-do-cerrado *in vitro* e *in vivo* (DE SOUZA, 2013; FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016). No estudo realizado por DE SOUZA (2013), esse estudo *in vivo* e *in vitro*, analisou-se a função antioxidante de extratos de tucum-do-cerrado em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foi observado que o extrato aquoso e etanólico da casca e da casca e polpa do tucum-do-cerrado protegiam as leveduras, melhorando a viabilidade celular na presença de diferentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, menadiona e hidroperóxido de cumene), em diferentes concentrações. DE SOUZA (2013) também verificou *in vitro* que os extratos da polpa e da casca do tucum-do-cerrado diminuíram danos

oxidativos a lipídios. Corroborando com esses resultados, FUSTINONI-REIS *et al.* (2016) observaram que ratos tratados com dieta enriquecida com ferro (350 mg/kg de dieta) e tucum-do-cerrado (150 g/kg de dieta) apresentaram menores níveis de danos oxidativos a lipídios e a proteínas em alguns tecidos como, fígado e baço, quando comparados ao grupo suplementado com ferro, e promoveu aumento da capacidade antioxidante do soro.

Por fim, um outro estudo recente identificou e quantificou compostos fenólicos e carotenoides em extratos da casca, polpa e semente do tucum-do-cerrado e algumas das suas funções fisiológicas *in vitro* (BOEING *et al.*, 2017). Similar ao encontrado por ROSA *et al.* (2016), no estudo de BOEING *et al.* (2017) foram identificadas diferentes classes de fenólicos nos extratos das três partes do fruto, como epicatequina e catequina (flavanois), piceatanol (estilbeno) e diferentes glicosídeos de cianidina (antocianinas). Nesse mesmo estudo foi observado *in vitro* que os extratos das três partes do tucum-do-cerrado (casca, polpa e semente) foram capazes de remover espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, protegendo células do epitélio intestinal (Caco-2). Desse modo, os autores corroboram com a hipótese que o tucum-do-cerrado seja um importante alimento com potencial antioxidante além de apresentar efeitos biológicos positivos.

Considerando o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do tucum-do-cerrado (DE SOUZA, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013; FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016; BOEING *et al.*, 2017), bem como a alta concentração de compostos fenólicos presentes neste fruto (ROSA *et al.*, 2016; BOEING *et al.*, 2017), sugere-se que o consumo de tucum-do-cerrado pode diminuir os efeitos deletérios do estresse oxidativo e da inflamação causados pelo excesso de ferro, prevenindo ou retardando o aparecimento de marcadores do envelhecimento.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Geral

Investigar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) sobre marcadores moleculares associados ao envelhecimento em ratos adultos suplementados ou não com ferro.

1.3.2. Específicos

- Avaliar os níveis de danos oxidativos a lipídios e a proteínas no fígado, no baço, no intestino e no rim de ratos adultos tratados com dieta adicionada de 15% tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) associada ou não à suplementação de ferro.
- Avaliar a capacidade antioxidante do fígado e no rim de ratos adultos tratados com dieta adicionada de 15% tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) associada ou não à suplementação de ferro.
- Avaliar marcadores de inflamação (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em nível de mRNA no fígado e em nível de proteína no soro de ratos adultos tratados com dieta adicionada de 15% tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) associada ou não à suplementação de ferro.
- Avaliar os marcadores de envelhecimento (sirtuína 1, sirtuína 3 e proteína marcadora de senescência 30) no fígado e no rim de ratos adultos tratados com dieta adicionada de 15% tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) associada ou não à suplementação de ferro.

1.4. MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1. Aquisição do fruto e preparo das rações

As amostras de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) foram coletadas durante o período de frutificação (de janeiro a março de 2014), no estado de maturação, em uma fazenda localizada em Terezópolis de Goiás, 16°28'15.4"S e 49°03'44.1"W, Goiás, Brasil. Uma subamostra da espécie foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília, com número de identificação 124364. A permissão para coletar essa amostra foi emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) / Ministério do Meio Ambiente (número de autorização 9/2012, IBAMA/Ministério do Meio Ambiente). Os frutos foram lavados com água destilada e estocados à -80°C até o momento do preparo da ração.

As rações foram preparadas mensalmente à partir da mistura dos ingredientes (Rhoster, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) seguindo a proporção dos ingredientes proposta por REEVES *et al.* (1993), descritas na tabela 1. Para utilização do tucum-do-cerrado como parte das rações, as sementes dos frutos congelados foram removidas, a polpa e a casca foram homogeneizadas em liquidificador com uma pequena quantidade de água e, posteriormente, homogeneizadas aos componentes das rações. As rações foram peletizadas e estocadas a -20° C.

As quantidades e as proporções de macronutrientes da dieta acrescida com tucum-do-cerrado foram ajustadas visando adequar estes nutrientes conforme as recomendações previstas na dieta AIN-93G para roedores (REEVES *et al.*, 1993; Tabelas 1, 2 e 3). A composição do tucum-do-cerrado e das dietas está apresentada na tabela 4. A quantidade de tucum-do-cerrado utilizada no estudo (150 g do fruto para cada quilograma de dieta) foi estabelecida considerando-se a recomendação de cinco porções diárias de frutas e hortaliças para adultos saudáveis, especificadas no Guia Alimentar para População Brasileira (BRASIL, 2008), respeitando a proporção entre a quantidade total de alimento consumida por um indivíduo adulto em um dia e a quantidade consumida por um rato adulto. A dose de suplementação de ferro utilizada foi dez vezes superior a recomendada para roedores, esse valor foi estabelecido baseando-se na dose de suplementação utilizada em seres humanos adultos que é cerca de dez vezes maior que o de Ingestão Dietética Recomendada (RDA).

Tabela 1. Composição da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento.

Ingrediente	g / Kg de dieta
Amido de milho	397,5
Caseína (proteína > 85%)	200,0
Amido dextrinizado (tetrassacarídeo 90-94%)	132,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja (sem aditivos)	70,0
Fibra	50,0
Mix mineral	35,0
Mix vitamínico	10,0
L-cistina	3,0
Bitartarato de colina (colina 41,1%)	2,5
Terc-butil hidroquinona	0,014

Fonte: (REEVES *et al.*, 1993).

Tabela 2. Composição do Mix Mineral da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento.

Elementos minerais	mg / Kg de dieta
Cálcio	5.000,0
Fósforo	1.561,0
Potássio	3.600,0
Enxofre	300,0
Sódio	1.019,0
Cloreto	1.571,0
Magnésio	507,0
Ferro	35,0
Zinco	30,0
Manganês	10,0
Cobre	6,0
Iodo	0,2
Modibilênio	0,15
Selênio	0,15

Fonte: (REEVES *et al.*, 1993).

Tabela 3. Composição do Mix Vitamínico da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento.

Vitamina	U / Kg de dieta
Niacina (B3), mg	30
Ácido pantotênico (B5), mg	15
Piridoxina (B6), mg	6
Tiamina (B1), mg	5
Riboflavina (B2), mg	6
Ácido Fólico, mg	2
Vitamina K, µg	750
Biotina, µg	200
Vitamina B12, µg	25
Vitamina A, UI	4.000
Vitamina D3, UI	1.000
Vitamina E, UI	75

Fonte: (REEVES *et al.*, 1993).

Tabela 4. Composição das rações dos diferentes grupos de tratamento.

Componentes	Diets (g/kg)			
	Controle	+Ferro	Tucum	Tucum + Ferro
Amido	397,5	397,5	369,6	369,6
Carboidrato (tucum-do-cerrado)	n.a.	n.a.	27,8	27,8
Proteína (caseína)	200,0	200,0	198,3	198,3
Proteína (tucum-do-cerrado)	n.a.	n.a.	1,7	1,7
Amido dextrinizado	132,0	132,0	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0
Óleo de soja	70,0	70,0	69,7	69,7
Lipídios (tucum-do-cerrado)	n.a.	n.a.	0,3	0,3
Fibra (celulose)	50	50	47,5	47,5
Fibra (tucum-do-cerrado)	n.a.	n.a.	2,5	2,5
Mix vitamínico	10,0	10,0	10,0	10,0
Mix mineral isento de ferro	35,0	35,0	35,0	35,0
L-cistina	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Ferro	0,035	0,350	0,035	0,350

n.a., não apresenta

1.4.2. Animais

Trinta e dois ratos Wistar machos (Granja GR, São Paulo, Brasil), 25 dias de idade ($75,0 \pm 6,6$ g), foram alojados em gaiolas individuais, em biotério com ciclos de luz / escuridão de 12/12 h e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. A dieta foi ofertada no período das 16h às 8h, com livre acesso à água. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília, UnB, UnBDoc nº 20855/2014.

1.4.3. Protocolo experimental

Após quatro semanas de aclimação com dieta padrão para roedores em crescimento, AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993) para que os animais atingissem a idade adulta ($248,9 \pm 18,6$ g), os animais foram então alocados em quatro grupos experimentais (oito ratos por grupo) e alimentados com as seguintes dietas:

- **Controle (CT):** Dieta AIN-93G, com 35 mg de ferro / kg de dieta;
- **+Ferro (+Fe):** Dieta AIN-93G contendo 350 mg de ferro / kg de dieta;
- **Tucum-do-cerrado (Tuc):** Dieta AIN-93G + 150 g de tucum-do-cerrado / kg de dieta;
- **Tucum-do-cerrado + Ferro (Tuc+Fe):** Dieta AIN-93G contendo 350 mg de ferro/ kg dieta + 150 g de tucum-do-cerrado / kg de dieta;

Após 12 semanas de tratamento, os animais ($457,6 \pm 45,3$ g) foram anestesiados com isoflurano em câmara anestésica, seguida de punção cardíaca. O fígado, o baço, o intestino e o rim foram removidos e lavados em solução salina (NaCl, 0,9%) a 4° C, imediatamente congelados em nitrogênio líquido (N₂) e estocados a -80 °C para análises posteriores. O sangue foi coletado em dois tubos com e sem EDTA 7% (21µL/mL sangue).

1.4.4. Consumo de dieta e ganho de peso

O consumo de dieta foi determinado diariamente pela diferença entre a quantidade de dieta ofertada e as sobras. Os animais foram pesados semanalmente em balança analítica (Marte, ASF11, São Paulo, SP, Brasil) para a avaliação ponderal, antes de receberem a ração.

1.4.5. Parâmetros hematológicos

Para análise de parâmetros hematológicos, o sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos de 1,5 mL com EDTA 7% (21µL/mL sangue). Foram determinados os seguintes parâmetros: eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), plaquetas (PTL) e células brancas (WBC) utilizando contador de células ABX Micros ESV 60 (Horiba, Kyoto, Japão) com parâmetros definidos para ratos, no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.

1.4.6. Concentração de ferro na dieta e nos tecidos

A concentração de ferro no fígado, baço, intestino, rim e nas dietas foi determinada por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado (ICP/AES, Spectro, Kleve, Alemanha), segundo método descrito por BARANOWSKA *et al.* (1995) com modificações. Amostras de fígado (0,3 g), de baço (0,1 g), de intestino (0,4 g), de rim (0,4 g) e de ração (0,5 g) foram digeridas com 5 mL HNO₃ PA (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) e 2,5 mL H₂SO₄ PA (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) em sistema biodigestor micro-ondas Provecto Analítica (DGT 100 Plus; Provecto Analítica, Jundiaí, São Paulo, Brasil), utilizando-se o seguinte programa: 5 min – 330 W; 6 min – 700 W; 1 min – 800 W; 20 min – 0 W (resfriamento). Após a digestão, as amostras foram ressuspensas em HNO₃ 0,1

mol/L para um volume final de 25 mL. A concentração de ferro nas amostras foi determinada por espectrometria de emissão atômica (ICP-AES; Spectro, Kleve, Alemanha), linha 238 nm, utilizando curva de calibração com Fe (Titrisol-Merck) no intervalo de 0 a 10 ppm. Os resultados foram expressos em µg de ferro por g de tecido. A exatidão do método para quantificação de ferro foi determinada utilizando uma amostra de referência (Rice Flour, SRM 1658a, United States Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA), analisada em triplicata. Todas as vidrarias utilizadas nas análises foram lavadas com HCl 10% e posteriormente lavadas com água deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation).

1.4.7. Status de ferro sérico

1.4.7.1. Ensaio de dosagem de ferro sérico

A avaliação de ferro sérico foi realizada utilizando-se um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A 115 µL de soro foram adicionados 460 µL de tampão (acetato de sódio 43 g/L, ácido acético 3%, ácido tioglicólico 0,4%), seguido de leitura da absorbância a 560 nm. Posteriormente, 11,5 µL de Ferrozina® foram adicionadas às amostras e estas foram incubadas em termobloco (Termomixer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 37° C por 10 min e a absorbância determinada a 560 nm em espectrofotômetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão). A determinação da concentração de ferro sérico foi feita utilizando uma curva-padrão de seis pontos, com solução padrão de ferro na faixa de concentração de 50 a 400 µg de ferro/dL ($y = 0,001 x + 0,004$; $r^2 = 0,99895$). As análises foram realizadas em duplicata.

1.4.7.2. Ensaio de capacidade latente de ligação do ferro (CLLF)

A capacidade latente de ligação de ferro (CLLF) foi determinada utilizando-se um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, à cada 100 µL de soro foram adicionados 750 µL de tampão (Tris 300 mmol/L; cloreto férrico ≥ 35 µmol/L; hidrogenocarbonato de sódio ≥ 150 µmol/L), seguido de incubação em banho-maria a 37° C por 5 min. O mesmo foi realizado com a amostra do branco, que continha todos os reagentes descritos acima exceto o soro. Após a incubação, a absorbância (A1) foi determinada a 560 nm em espectrofotômetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão). Posteriormente, à cada amostra

foram adicionados 200 µL de Ferrozina®, seguido de incubação em banho-maria a 37° C por 5 min e determinação da absorbância (A2) a 560 nm espectrofotômetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão). Uma amostra com valor de CLLF conhecido foi utilizada como calibrador (cal). A absorbância das amostras foi determinada a partir da diferença dos valores de A2 e A1 (eq. I), enquanto o valor de CLLF das amostras foi calculado a partir da razão entre a absorbância da amostra e do calibrador, multiplicado pelo valor de CLLF do calibrador (eq. II).

$$\text{Absorbância da amostra} = A2 - A1 \quad (\text{I})$$

$$\text{CLLF } (\mu\text{g/dL}) = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do calibrador}} \times \text{CLLF calibrador} \quad (\text{II}).$$

1.4.7.3. Determinação da capacidade total de ligação do ferro (CTLF), saturação de transferrina (ST%) e transferrina

A capacidade total de ligação de ferro (CTLF) foi obtida à partir da soma dos valores de ferro sérico e CLLF (eq. III), enquanto a saturação de transferrina (%ST) foi determinada a partir da razão dos valores de ferro sérico pelos valores de CTLF e multiplicados por 100 (eq. IV). A concentração de transferrina foi feita a partir da multiplicação do valor de CTLF por 0,70 (eq. V).

$$\text{CTLF } (\mu\text{g/dL}) = \text{Ferro sérico} + \text{CLLF} \quad (\text{III})$$

$$\%ST = \frac{\text{Ferro sérico}}{\text{CTLF}} \times 100 \quad (\text{IV})$$

$$\text{Transferrina } (\text{mg/dL}) = \text{CTLF} \times 0,70 \quad (\text{V}).$$

1.4.8. Marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante

1.4.8.1. Danos a proteínas: proteínas carboniladas

A dosagem de proteínas carboniladas foi realizada de acordo com RICHERT *et al.* (2002). Cerca de 0,1g de fígado, baço, intestino e rim foi homogeneizado utilizando homogeneizador elétrico (TissueRuptor, QIAGEN, Austin, Texas, EUA) na proporção de 1:20 (p/v) em tampão Tris HCl 25

mmol/L contendo ureia 6 mol/L (pH 9,0). Três alíquotas de 200 µL de homogeneizado foram transferidas para microtubos e adicionados 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% para precipitação das proteínas. Uma alíquota do homogeneizado foi armazenada a -20° C para posterior análise de proteína total. Os tubos contendo homogeneizado e TCA foram agitados e centrifugados a 10.000 x g por 2 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 µL de Tris HCl 25 mmol/L contendo ureia 6 mol/L, onde foram adicionados 700 µL de 2,4- dinitrofenil-hidrazina (DNPH) 0,2% em HCl 2 mol/L às alíquotas correspondentes às amostras e 700 µL de HCl 2 mol/L à alíquota correspondente ao branco. Os microtubos foram agitados a 4° C em termobloco (Termomixer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 15 min e posteriormente adicionados de 700 µL de TCA 20% e novamente centrifugadas a 10.000 x g por 2 min. Os sobrenadantes de todas as alíquotas foram descartados e lavados três vezes com 1 mL de solução de acetato de etila : etanol (1:1) e centrifugados a 10.000 x g, por 2 min. O precipitado foi deixado à temperatura ambiente por 10 min para evaporação do excesso de acetato de etila:etanol e posteriormente ressuspendido em 500 µL de tampão fosfato de potássio 500 mmol/L contendo 6 mol/L de guanidina (pH 2,5). Em seguida, as amostras foram agitadas a 4° C em termobloco (Termomixer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 30 min e centrifugadas 10.000 x g por 2 min. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 376 nm.

A concentração de proteínas carboniladas foi determinada utilizando a diferença de absorbância entre a amostra e o branco e o coeficiente de extinção molar do complexo proteína-DNPH, de 22 mmol/L⁻¹cm⁻¹ A_{376 nm} (RICHERT *et al.*, 2002). A concentração de proteína total em cada homogeneizado foi determinada pelo método de HARTREE (1972), e os resultados expressos em nmol de carbonil por mg de proteína total.

1.4.8.2. Danos a lipídios: peroxidação lipídica

O nível de peroxidação lipídica no fígado, no baço, no intestino e no rim foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), de acordo com a metodologia proposta por CANDAN e TUZMEN (2008), com modificações. Cerca de 0,1 g de tecido foi homogeneizado em ácido sulfúrico 1%, com diluição final de tecido:solução de 1:20 (p/v) utilizando homogeneizador elétrico TissueRuptor (QIAGEN, Austin, Texas, EUA) e em seguida centrifugado a 10.000 x g por 15 min a 4°C. Uma alíquota do homogeneizado foi estocada para posterior análise de proteína total.

Após a centrifugação, 500 µL do sobrenadante do homogeneizado foram transferidos para microtubos e adicionados 750 µL de ácido fosfórico 440 mmol/L e 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 42 mmol/L, posteriormente agitados em vórtex e incubados em termobloco (Termomixer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 100° C por 1h para a formação do complexo TBA e malondialdeído (MDA). Após a incubação e resfriamento, 500 µL da amostra foram transferidos para outro microtubo e adicionados de 500 µL de solução metanol pureza HPLC : hidróxido de sódio 1 mol/L (91:9). As amostras foram centrifugadas por 5 min a 10.000 x g a 4° C e o sobrenadante foi filtrado em membrana de nylon 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millipore, MA, EUA) e 100 µL aplicados em sistema HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizando coluna Shim-park C18 CLC-ODS 25 cm e detector de fluorescência. O comprimento de onda de excitação utilizado foi 532 nm, com emissão monitorada a 553 nm. A eluição do complexo MDA-TBA foi realizada utilizando fase móvel metanol:tampão fosfato 50 mmol/L, na proporção de 60:40 com fluxo mantido em 0,6 mL/min, temperatura de 30° C, com tempo de corrida de 6 min por amostra.

Para determinação da concentração de MDA foi construída uma curva-padrão a partir da hidrólise do composto 1,1,3,3- tetraethoxy-propano 97% (TEP; Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) em ácido sulfúrico 1%. As concentrações de MDA utilizada para construção da curva padrão foram: 0,101; 0,202; 0,404; 0,808; 2,02 nmol/mL ($y = 2 \cdot 10^{-5}x - 0,043$; $r^2 = 0,9957$). A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de HARTREE (1972) e a concentração de MDA foi expressa em nmol de MDA por mg de proteína total.

1.4.8.3. Atividade Enzimática

A atividade específica das enzimas catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), glutathiona redutase (GR) e Glutathiona-S-transferase (GST) foi determinada no fígado e no rim. Para isso, as amostras de tecidos referentes aos ensaios da atividade de CAT, GPx, GR e GST foram homogeneizadas na proporção tecido: solução de 1:40 (p/v) para fígado e 1:20 (p/v) para rim, em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), contendo EDTA 0,5 mmol/L, enquanto para o ensaio de SOD as amostras foram homogeneizadas na proporção tecido: solução de 1:50 (p/v) para fígado e 1:20 (p/v) para rim em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,8) contendo EDTA 0,5 mmol/L, utilizando homogeneizador elétrico (TissueRuptor QIAGEN, Austin, Texas, EUA). Antes da homogeneização, foi adicionado ao tampão fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mmol/L, preparado

em etanol 95% na proporção de 1% do volume de homogeneizado total. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a $13.000 \times g$ a 4°C , por 20 min, e o sobrenadante utilizado para determinação das atividades enzimáticas e dosagem de proteínas totais.

1.4.8.3.1. Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi avaliada a partir do consumo de H_2O_2 , de acordo com JOANISSE e STOREY (1996). Para tanto, foi utilizado um sistema contendo 5 μL de homogeneizado de fígado ou 10 μL de homogeneizado de rim, tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L e H_2O_2 10 mmol/L, concentrações finais, com volume reacional final de 500 μL . A absorbância foi monitorada a 240 nm por 20s e a atividade enzimática calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 a 240nm de $0,0394 \text{ mmol/L}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 μmol de H_2O_2 / min. Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína.

1.4.8.3.2. Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi determinada utilizando H_2O_2 como substrato, medindo-se, neste caso, apenas a atividade da GPx selênio dependente. A oxidação de NADPH pela GR foi monitorada pela leitura espectrofotométrica a 340 nm por 20s (JOANISSE e STOREY, 1996). Foi utilizado um sistema reacional com volume final de 500 μL contendo tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L, NaN_3 2 mmol/L, GR 1,5 IU/mL, NADPH 0,15 mmol/L, GSH 5 mmol/L, H_2O_2 0,2 mmol/L concentrações finais e 20 μL de homogeneizado de fígado ou 40 μL de homogeneizado de rim. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 340 nm (HERMES-LIMA e STOREY, 1996). Uma unidade (U) de GPx foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min. Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína.

1.4.8.3.3. Superóxido Dismutase (SOD)

O ensaio de SOD foi realizado pelo protocolo proposto por MCCORD e FRIDOVICH (1969), SUN *et al.* (1988) e adaptado por MCCORD (2001). A reação consiste na produção do íon superóxido

a partir do substrato hipoxantina, reação catalisada pela xantina oxidase. O íon superóxido por sua vez reduz o citocromo c. A cinética da reação de redução do citocromo c foi monitorada por meio da leitura da absorvância a 550 nm. Um sistema reacional com volume final de 500 μL contendo tampão fosfato de potássio 50 mmol/L pH 7,8, EDTA 0,5 mmol/L, citocromo c predominantemente oxidado 0,01 mmol/L, hipoxantina 0,05 mmol/L, homogeneizado de tecido e xantina oxidase suficiente para gerar uma taxa de redução do citocromo c de 0,025 abs/min.

Para o cálculo da atividade enzimática, foi definida que uma unidade (U) de SOD correspondia à quantidade de enzima necessária para diminuir em 50% a redução do citocromo c, o qual contém 1 mg de proteína. Para obtenção desse dado, o ensaio foi realizado utilizando diferentes volumes de um mesmo homogeneizado (5, 10, 25 e 50 μL para fígado e 5, 10, 50 e 150 μL para rim). Uma função logarítmica foi gerada ao se plotar os dados das quantidades de homogeneizado utilizadas e os respectivos percentuais de inibição da redução do citocromo C. A partir desta função foi possível encontrar o valor correspondente a uma unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína.

1.4.8.3.4. Glutathione Redutase (GR)

A atividade de GR foi determinada pelo monitoramento da oxidação de NADPH a 340nm por 30s, de acordo com o proposto por JOANISSE e STOREY (1996). Para tanto foi utilizado um sistema reacional com volume final de 500 μL contendo tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L, NADPH 0,2 mmol/L, GSSG 1 mmol/L e 40 μL de homogeneizado de fígado ou 60 μL de homogeneizado de rim. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH a 340 nm de $6,22 \text{ mmol/L}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uma unidade (U) de GR foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min. Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína.

1.4.8.3.5. Glutathione S Transferase (GST)

A atividade de GST foi determinada através da reação de conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), e conseqüente formação do complexo S-2,4-dinitrofenil-glutathione, detectado a 340 nm. Um sistema reacional com volume final de 500 μL contendo

tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L, CDNB 1 mmol/L, GSH 1 mmol/L (valores de concentração final) e 50 μ L de homogeneizado de fígado ou 75 μ L de homogeneizado de rim. A atividade enzimática foi quantificada utilizando o coeficiente de extinção molar a 340 nm do complexo S-2,4-dinitrofenil-glutathiona de 9,6 mmol/L⁻¹cm⁻¹. Uma unidade (U) de GST foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de produto/min (HABIG e JAKOBY, 1981). Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína. Os resultados foram expressos como U enzima / mg de proteína.

1.4.9. Determinação dos Níveis de Transcritos

1.4.9.1. Extração de RNA Total, Eletroforese, Precipitação com Acetato e Síntese de cDNA

A extração de RNA total do fígado e do rim dos ratos foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Aproximadamente 0,1 g de tecido foi homogeneizado em TRIzol[®] (1 mL para cada 0,1 g de tecido), utilizando homogeneizador elétrico (TissueRuptor, QIAGEN, Austin, Texas, EUA) com as amostras imersas em gelo, seguida de centrifugação a 10.000 x g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e 200 μ L de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados, seguido de incubação por 3 min à temperatura ambiente e posterior centrifugação a 10.000 x g a 4°C por 10 min, para separação da fase orgânica e fase aquosa. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e 500 μ L de álcool isopropílico (J. T. Baker, Xalostoc, Edo de Méx, México) foram adicionados para a precipitação do RNA, seguida de centrifugação a 10.000 x g a 4°C por 10 min. O *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL etanol 75% (J. T. Baker, Xalostoc, Edo de Méx, México), para remoção de impurezas, seco a temperatura ambiente, ressuspendido em água deionizada e estocados a -80° C.

As amostras de RNA foram precipitadas com acetato de sódio anidro 3 mol/L e pH 5,2 (0,1 x volume da amostra) e etanol (2,5 x volume da amostra), incubadas a 4° C por 30 min e centrifugadas a 10.000 x g por 30 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado 1 mL de etanol 75% a 4° C foi adicionado. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4° C, seguida do descarte do sobrenadante. O *pellet* de RNA foi seco a temperatura ambiente e posteriormente ressuspendido em água deionizada.

A concentração do RNA total foi determinada por leitura a 260 nm em espectrofotômetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão), e dada pela fórmula:

$$\text{Concentração de RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição}$$

Onde, A_{260} é valor de leitura da amostra a 260 nm, 40 é o coeficiente médio de extinção do RNA (AZEVEDO *et al.*, 2010).

O grau de pureza das amostras de RNA foi avaliado por espectrofotometria calculando a razão das absorbâncias a A_{260}/A_{280} nm, para verificação de contaminação com proteínas e A_{260}/A_{230} nm para verificação de contaminação com compostos fenólicos. Foram considerados como adequados valores das razões maiores ou iguais que 1,8 (AZEVEDO *et al.*, 2010).

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, onde uma alíquota de 600 ng de RNA foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil), tampão de corrida TAE 1x (Tris: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil / Ácido Bórico: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil / Ácido Etilenodiaminotetracético: Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e corado com 5 μL GelGreen™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). O gel foi analisado utilizando o *software* do sistema de fotodocumentação L – Pix HE Image (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil) para confirmar ausência de material genético degradado.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Um mix 2X contendo 10X RT Buffer, 10X Random primers, dNTPmix, RNase inhibitor e MultiScribe™ Reverse Transcriptase, com volume final de 10 μL foi preparado e posteriormente adicionado a um tubo contendo 10 μL de amostra de RNA (na concentração 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Para a realização da transcrição reversa foi utilizado termociclador (Esco, Swift Maxi, Hatboro, PA, EUA) utilizando-se os seguintes parâmetros: 25° C por 10 min; 37° por 120 min; 85° por 5 min. Ao final da reação as amostras de cDNA foram estocadas a -20° C para posterior utilização. Uma reação de síntese de cDNA sem a enzima transcriptase reversa foi realizada para cada amostra como controle negativo. Destas amostras, uma alíquota foi submetida a reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) para verificar ausência de contaminação por DNA genômico.

1.4.9.2. Determinação dos níveis de mRNA de genes associados ao metabolismo de ferro, à inflamação e ao envelhecimento

Os níveis de transcritos de hepcidina (Hamp), fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2), NAD(P)H: desidrogenase-(quinona)1 (Nqo1), heme oxigenase 1(Hmox1), interleucina 1-beta (Il1b), fator de necrose tumoral-alfa (Tnfa), proteína marcadora da senescência 30 (Smp30), sirtuína 1 (Sirt1) e Sirt3 foram determinados pela amplificação utilizando-se o sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR; StepOne Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cingapura). Os tecidos nos quais as concentrações de mRNA foram determinadas estão listados na tabela 5.

A qPCR foi realizada utilizando 2 µL de cDNA, 5 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,2 µmol/L (concentração final) de cada primer (Tabela 5), com volume final de 10 µL. A amplificação do gene de interesse foi realizada utilizando-se um sistema de reação de 40 ciclos (desnaturação: 95° C por 20 s; hibridação: 95° C por 3 s e 60° C por 30 s; estágio da curva de dissociação: 95° C por 15 s, 60° C por 60 s, 95° C por 15 s e 60° C por 15 s). Todas as reações foram feitas em triplicata e a especificidade de cada produto amplificado foi verificada a partir da curva de dissociação (*Melting curve*).

Tabela 5. Sequências de *primers* utilizados para ensaio de qPCR para os genes Nrf2, Nqo1, Hmox1, Il1b, Tnfa, Smp30, Sirt1, Sirt3 e Actb.

Gene	Tecido analisado	Sequência dos Primers (5' - 3')	Número de acesso no GenBank
Hamp	Fígado	TGATGCTGAAGCGAAGGA (<i>forward</i>) TGTGTTGAGAGGTCAGGAC (<i>reverso</i>)	NM_053469
Nrf2	Fígado	GAGACGGCCATGACTGAT (<i>forward</i>) GTGAGGGGATCGATGAGTAA (<i>reverso</i>)	NM_031789.2
Nqo1	Fígado	CAGCGGCTCCATGTACT (<i>forward</i>) GACCTGGAAGCCACAGAAG (<i>reverso</i>)	NM_017000.3
Hmox1	Fígado	ATCGTGCTCGCATGAAC (<i>forward</i>) CAGCTCCTCAAACAGCTCAA (<i>reverso</i>)	NM_012580
Il1b	Fígado	CACCTCTCAAGCAGACACAG (<i>forward</i>) GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC (<i>reverso</i>)	NW_047658
Tnfa	Fígado	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC (<i>forward</i>) GTCGTAGCAAACCACCAAGCAGA (<i>reverso</i>)	X66539
Smp30	Rim	AGGCATCAAAGTGTCTGCTGTTT (<i>forward</i>) GACTGTCTGAAGTGCCACTGAACT (<i>reverso</i>)	X69021
Sirt1	Fígado e rim	CTGTTTCTGTGGGATACCTGACT (<i>forward</i>) ATCGAACATGGCTTGAGGATCT (<i>reverso</i>)	XM_003751934
Sirt3	Fígado e rim	CCCGCTGCCCTGTCTGT (<i>forward</i>) CTCCCCAAAGAACACAATGTCA (<i>reverso</i>)	NM_001106313
Actb	Fígado e rim	GTCGTACCACTGGCATTGTG (<i>forward</i>) CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA (<i>reverso</i>)	NM_031144

Para determinação da eficiência das reações, curvas-padrão de cada gene de interesse foram construídas utilizando o valor do ciclo de amplificação (C_T) versus log da concentração de cDNA e a eficiência foi determinada a partir do valor do coeficiente angular da reta, através da equação:

$$E (\%) = (10^{-1/\text{inclinação}} - 1) \times 100$$

Onde, E corresponde à eficiência da reação e a inclinação corresponde ao valor do coeficiente angular da reta. A eficiência do qPCR foi considerada válida quando entre 90 e 110%.

Outra curva foi construída utilizando-se os valores de ΔC_T (C_T gene de interesse - C_T gene constitutivo) versus o log das diluições de cDNA em unidades arbitrárias, para cada gene de interesse. Foram consideradas válidas as curvas com valor de coeficiente angular da reta menor ou igual a 0,1. A validação foi realizada segundo o tutorial "Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR" (Part #: 4371095 Rev B, Applied Biosystems).

A expressão gênica relativa entre os diferentes tipos de tratamento foi calculada utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A expressão dos genes foi calculada utilizando os valores do C_T e os resultados expressos como o número de vezes expresso em relação ao gene constitutivo β -actina (Actb).

1.4.10. Análise das proteínas Nrf2, SIRT1 e SIRT3 por *Western Blotting*

Para a extração de proteínas totais, cerca de 0,2 g de tecido dos ratos (fígado e rim) foi homogeneizada em tampão de homogeneização contendo: sacarose 0,25 M, Tris-HCl 15 mM (pH 7,9), NaCl 15 mM, KCl 60 mM, EDTA 5 mM, espermina 0,15 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), espermidina 0,5 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, UA), fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ditioneitol 1,0 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), coquetel inibidor de protease 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), coquetel inibidor de fosfatase 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), na proporção de 1:2 (p/v). Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 x g por 10 min, a 4° C. Ao final, os sobrenadantes foram estocados a -80°C para posterior análise. A concentração de proteína total dos sobrenadantes dos homogeneizados de tecido foi determinada pelo método de HARTREE (1972).

A separação de proteínas foi realizada por SDS-PAGE 12% (AZEVEDO *et al.*, 2010), utilizando o sistema de eletroforese MINI-PROTEAN (BIO-RAD, Hercules, Califórnia, EUA) e tampão

de corrida 1x (Tris 25 mmol/L, Glicina 0,192 mol/L e SDS 0,1%). A cada poço do gel foram aplicados 40 µg de proteína total de cada homogeneizado. Posteriormente as proteínas foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,45 µm (membrana de transferência Immobilon®-P - IPVH00010 - Millipore - Billerica MA, EUA), utilizando o sistema de transferência Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD, Hercules, Califórnia, EUA) e tampão de transferência contendo: Tris 48 mmol/L, Glicina 39 mmol/L e Metanol 20%, com pH entre 9,0 e 9,4.

Posteriormente, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio (tampão tris-salina 1x, Tween 20 0,1% e leite em pó desnatado 5% - TBS/T 1x com leite 5%), por 2h, e então lavadas três vezes com TBS-T 1x. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo primário específico a cada uma das proteínas de interesse em agitador basculante com velocidade mediana, à 4° C, *overnight*. Os tecidos analisados e as diluições utilizadas para cada anticorpo estão descritas na tabela abaixo (Tabela 6).

Tabela 6. Descrição dos tecidos e anticorpos primários utilizados na imunodeteção de proteínas por *Western Blotting*.

Proteína	Tecidos analisado	Diluição	Código/Marca
Nrf2	Fígado	1:200	sc-13032 / Santa Cruz Biotechnology
SIRT1	Fígado e rim	1:1000	#9475 / Cell Signaling Technology
SIRT3	Fígado e rim	1:1000	#5490 / Cell Signaling Technology
β-actina	Fígado e rim	1:1000	#4967S / Cell Signaling Technology

Após o período de incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T 1x três vezes e sensibilizadas por 1h com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina na diluição de 1:1000 (#7054-Anti-rabbit IgG, AP-linked Antibody, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA). As membranas foram então lavadas três vezes com TBS-T 1x e as bandas foram reveladas utilizando solução BCIP® / NBT (B6404 - Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) e quantificadas em sistema de análise de imagem ImageStudio Lite (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). A proteína β-actina foi utilizada com proteína constitutiva. Os dados foram expressos como unidades arbitrárias obtidas pela razão entre as intensidades das proteínas de interesse e a constitutiva β-actina.

1.4.11. Determinação dos níveis séricos de IL-6, IL-1 β e TNF- α por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os níveis séricos de IL-6, IL-1 β e TNF- α foram avaliados utilizando kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA; IL-6 - Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA; IL-1 β e TNF- α - Bender MedSystems, Vienna, Austria). Microplacas previamente sensibilizadas com anticorpo específico para rato foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (PBS 1x + Tween 20 0,05%). Posteriormente, 100 μ L de soro e 50 μ L de biotina-conjugada foram adicionados e as microplacas incubadas em temperatura ambiente por 2h. Em seguida, as microplacas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem (PBS 1x + Tween 20 0,05%) e 100 μ L de estreptavidina conjugada a HRP adicionados a cada poço, seguido de incubação em centrífuga de microplaca a 100 x g por 1h. Novamente as microplacas foram lavadas e a cada poço foram adicionados 100 μ L de substrato (solução de tetrametilbenzidina - TMB), com posterior incubação à temperatura ambiente por cerca de 10 min. A reação foi interrompida com a adição de 100 μ L de solução de parada (H₂SO₄ 1 mol/L) e as absorbâncias das amostras foram determinadas a 450 nm em leitora de microplaca (SurinseTecan, Seestrasse, Männedorf, Suíça). Para determinação da concentração de cada citocina foi construída uma curva de calibração de seis pontos com padrões específicos.

1.4.12. Análise estatística

Para avaliação da normalidade dos dados, foi utilizado teste Kolmogorov-Smirnov e para comparações entre os tratamentos foi utilizado teste de comparações múltiplas (ANOVA) com correção de Bonferroni, utilizando o software SPSS (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

Referências

- AGARWAL, B.; BAUR, J. A. Resveratrol and life extension. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1215, p. 138-43, 2011.
- AHMED, S. M.; LUO, L.; NAMANI, A.; WANG, X. J. et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 2, p. 585-597, 2017.
- AIRES, D. J.; ROCKWELL, G.; WANG, T.; FRONTERA, J. et al. Potentiation of dietary restriction-induced lifespan extension by polyphenols. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 4, p. 522-6, 2012.
- ALVAREZ-RODRIGUEZ, L.; LOPEZ-HOYOS, M.; MUNOZ-CACHO, P.; MARTINEZ-TABOADA, V. M. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. **Cell Immunol**, v. 273, n. 2, p. 124-32, 2012.
- AMANO, A.; SATO, Y.; KISHIMOTO, Y.; TAKAHASHI, K. et al. Effects of ascorbic acid deficiency on protein and lipid oxidation in livers from SMP30/GNL knockout mice. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 59, n. 6, p. 489-95, 2013.
- ANGELONI, C.; LEONCINI, E.; MALAGUTI, M.; ANGELINI, S. et al. Role of quercetin in modulating rat cardiomyocyte gene expression profile. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 294, n. 3, p. H1233-43, 2008.
- ANNUZZI, G.; BOZZETTO, L.; COSTABILE, G.; GIACCO, R. et al. Diets naturally rich in polyphenols improve fasting and postprandial dyslipidemia and reduce oxidative stress: a randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr**, v. 99, n. 3, p. 463-71, 2014.
- ANSARI, A.; RAHMAN, M. S.; SAHA, S. K.; SAIKOT, F. K. et al. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. **Aging Cell**, v. 16, n. 1, p. 4-16, 2017.
- ARRUDA, L. F.; ARRUDA, S. F.; CAMPOS, N. A.; DE VALENCIA, F. F. et al. Dietary iron concentration may influence aging process by altering oxidative stress in tissues of adult rats. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61058, 2013.
- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. et al. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2010.
- BAI, P.; CANTO, C.; BRUNYANSZKI, A.; HUBER, A. et al. PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. **Cell Metab**, v. 13, n. 4, p. 450-60, 2011.
- BAI, P.; CANTO, C.; OUDART, H.; BRUNYANSZKI, A. et al. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. **Cell Metab**, v. 13, n. 4, p. 461-8, 2011.
- BARANOWSKA, I.; CZERNICKI, K.; ALEKSANDROWICZ, R. The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the upper Silesian industrial district. **Sci Total Environ**, v. 159, n. 2-3, p. 155-62, 1995.
- BARGER, J. L.; KAYO, T.; VANN, J. M.; ARIAS, E. B. et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2264, 2008.
- BAUR, J. A.; PEARSON, K. J.; PRICE, N. L.; JAMIESON, H. A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337-42, 2006.
- BAYRAM, B.; OZCELIK, B.; GRIMM, S.; ROEDER, T. et al. A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. **Rejuvenation Res**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2012.
- BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, n. 2 Suppl 1, p. 3-8, 2000.

- BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutr Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-29, 1992.
- BOEING, J. S.; RIBEIRO, D.; CHISTE, R. C.; VISENTAINER, J. V. et al. Chemical characterization and protective effect of the *Bactris setosa* Mart. fruit against oxidative/nitrosative stress. **Food Chem**, v. 220, p. 427-437, 2017.
- BOWIE, A.; O'NEILL, L. A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. **Biochem Pharmacol**, v. 59, n. 1, p. 13-23, 2000.
- BRACHMANN, C. B.; SHERMAN, J. M.; DEVINE, S. E.; CAMERON, E. E. et al. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. **Genes Dev**, v. 9, n. 23, p. 2888-902, 1995.
- BRAIDY, N.; GUILLEMIN, G. J.; MANSOUR, H.; CHAN-LING, T. et al. Age related changes in NAD+ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e19194, 2011.
- BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira : promovendo a alimentação saudável** Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica., 2008. 210 p
- BRUNE, M.; ROSSANDER, L.; HALLBERG, L. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. **Eur J Clin Nutr**, v. 43, n. 8, p. 547-57, 1989.
- BRUUNSGAARD, H.; LADELUND, S.; PEDERSEN, A. N.; SCHROLL, M. et al. Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people. **Clin Exp Immunol**, v. 132, n. 1, p. 24-31, 2003.
- CAITO, S.; RAJENDRASOZHAN, S.; COOK, S.; CHUNG, S. et al. SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. **FASEB J**, v. 24, n. 9, p. 3145-59, 2010.
- CALABRESE, V.; CORNELIUS, C.; TROVATO, A.; CAVALLARO, M. et al. The hormetic role of dietary antioxidants in free radical-related diseases. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 7, p. 877-83, 2010.
- CANDAN, N.; TUZMEN, N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 4, p. 708-13, 2008.
- CANTO, C.; SAUVE, A. A.; BAI, P. Crosstalk between poly(ADP-ribose) polymerase and sirtuin enzymes. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 6, p. 1168-201, 2013.
- CARLUCCIO, M. A.; SICULELLA, L.; ANCORA, M. A.; MASSARO, M. et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 4, p. 622-9, 2003.
- CARVALHO, J. A. M. D.; GARCIA, R. A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 3, p. 725-733, 2003.
- CHARLES, A. L.; MEYER, A.; DAL-ROS, S.; AUGER, C. et al. Polyphenols prevent ageing-related impairment in skeletal muscle mitochondrial function through decreased reactive oxygen species production. **Exp Physiol**, v. 98, n. 2, p. 536-45, 2013.
- CHEN, C. J.; FU, Y. C.; YU, W.; WANG, W. SIRT3 protects cardiomyocytes from oxidative stress-mediated cell death by activating NF-kappaB. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 430, n. 2, p. 798-803, 2013.
- CHEN, H.; LUKAS, T. J.; DU, N.; SUYEOKA, G. et al. Dysfunction of the retinal pigment epithelium with age: increased iron decreases phagocytosis and lysosomal activity. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, n. 4, p. 1895-902, 2009.

- CHENG, Y.; TAKEUCHI, H.; SONOBE, Y.; JIN, S. et al. Sirtuin 1 attenuates oxidative stress via upregulation of superoxide dismutase 2 and catalase in astrocytes. **J Neuroimmunol**, v. 269, n. 1-2, p. 38-43, 2014.
- CHUN, K. S.; KUNDU, J.; KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Targeting Nrf2-Keap1 signaling for chemoprevention of skin carcinogenesis with bioactive phytochemicals. **Toxicol Lett**, v. 229, n. 1, p. 73-84, 2014.
- COBAN, J.; OZTEZCAN, S.; DOGRU-ABBASOGLU, S.; BINGUL, I. et al. Olive leaf extract decreases age-induced oxidative stress in major organs of aged rats. **Geriatr Gerontol Int**, v. 14, n. 4, p. 996-1002, 2014.
- COHEN, J. E. Human population: the next half century. **Science**, v. 302, n. 5648, p. 1172-5, 2003.
- COPPE, J. P.; DESPREZ, P. Y.; KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. **Annu Rev Pathol**, v. 5, p. 99-118, 2010.
- CRICHTON, R. R.; WILMET, S.; LEGSSYER, R.; WARD, R. J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. **J Inorg Biochem**, v. 91, n. 1, p. 9-18, 2002.
- DA SILVA, D. B.; DA SILVA, N. T. V. J.; DE ANDRADE, L. R. M. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.
- DAS, S. K.; DESAULNIERS, J.; DYCK, J. R.; KASSIRI, Z. et al. Resveratrol mediates therapeutic hepatic effects in acquired and genetic murine models of iron-overload. **Liver Int**, v. 36, n. 2, p. 246-57, 2016.
- DE ROSSO, M.; TONIDANDEL, L.; LARCHER, R.; NICOLINI, G. et al. Identification of new flavonols in hybrid grapes by combined liquid chromatography-mass spectrometry approaches. **Food Chem**, v. 163, p. 244-51, 2014.
- DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A.; DA SILVA, T. L.; DE OLIVEIRA LIMA, L. C. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chem**, v. 156, p. 362-8, 2014.
- DE SOUZA, V. Y. V. **Análise da Proteção Antioxidante Promovida por Extratos de Tucum-do-cerrado (Bactris setosa)**. 2013. 80 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasília.
- DENCHER, N. A.; FRENZEL, M.; REIFSCHEIDER, N. H.; SUGAWA, M. et al. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1100, p. 291-8, 2007.
- DENIS, M. C.; DESJARDINS, Y.; FURTOS, A.; MARCIL, V. et al. Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. **Clin Sci (Lond)**, v. 128, n. 3, p. 197-212, 2015.
- DENIS, M. C.; FURTOS, A.; DUDONNE, S.; MONTOUDIS, A. et al. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53725, 2013.
- DOULIAS, P. T.; VLACHOU, C.; BOUDOURI, C.; KANAVAROS, P. et al. Flow cytometric estimation of 'labile iron pool' in human white blood cells reveals a positive association with ageing. **Free Radic Res**, v. 42, n. 3, p. 253-9, 2008.
- DUAN, W. Sirtuins: from metabolic regulation to brain aging. **Front Aging Neurosci**, v. 5, p. 36, 2013.
- EDREY, Y. H.; SALMON, A. B. Revisiting an age-old question regarding oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 71, p. 368-78, 2014.
- EVSTATIEV, R.; GASCHÉ, C. Iron sensing and signalling. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 933-52, 2012.

- FALANDRY, C.; BONNEFOY, M.; FREYER, G.; GILSON, E. Biology of cancer and aging: a complex association with cellular senescence. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 24, p. 2604-10, 2014.
- FENG, D.; KONDO, Y.; ISHIGAMI, A.; KURAMOTO, M. et al. Senescence marker protein-30 as a novel antiaging molecule. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1019, p. 360-4, 2004.
- FERRUCCI, L.; BLE, A.; BANDINELLI, S.; LAURETANI, F. et al. A flame burning within. **Aging Clin Exp Res**, v. 16, n. 3, p. 240-3, 2004.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-47, 2000.
- FORD, D. W.; HARTMAN, T. J.; STILL, C.; WOOD, C. et al. Diet quality and body mass index are associated with health care resource use in rural older adults. **J Acad Nutr Diet**, v. 114, n. 12, p. 1932-8, 2014.
- FRANCESCHI, C.; BONAFE, M.; VALENSIN, S.; OLIVIERI, F. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Ann N Y Acad Sci**, v. 908, p. 244-54, 2000.
- FRANCO, J. G.; DE MOURA, E. G.; KOURY, J. C.; TROTTA, P. A. et al. Resveratrol reduces lipid peroxidation and increases sirtuin 1 expression in adult animals programmed by neonatal protein restriction. **J Endocrinol**, v. 207, n. 3, p. 319-28, 2010.
- FUJITA, T.; INOUE, H.; KITAMURA, T.; SATO, N. et al. Senescence marker protein-30 (SMP30) rescues cell death by enhancing plasma membrane Ca(2+)-pumping activity in Hep G2 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 250, n. 2, p. 374-80, 1998.
- FUJITA, T.; SHIRASAWA, T.; MARUYAMA, N. Expression and structure of senescence marker protein-30 (SMP30) and its biological significance. **Mech Ageing Dev**, v. 107, n. 3, p. 271-80, 1999.
- FURUKAWA, A.; TADA-OIKAWA, S.; KAWANISHI, S.; OIKAWA, S. H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion. **Cell Physiol Biochem**, v. 20, n. 1-4, p. 45-54, 2007.
- FUSTINONI, A. M. **Efeito antioxidante do tucum-do-cerrado [Bactris setosa] em ratos submetidos ao estresse oxidativo induzido por ferro**. 2013. 102 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasília.
- FUSTINONI-REIS, A. M.; ARRUDA, S. F.; DOURADO, L. P.; DA CUNHA, M. S. et al. Tucum-Do-Cerrado (Bactris setosa Mart.) Consumption Modulates Iron Homeostasis and Prevents Iron-Induced Oxidative Stress in the Rat Liver. **Nutrients**, v. 8, n. 2, 2016.
- GALARIS, D.; MANTZARIS, M.; AMORGIANIOTIS, C. Oxidative stress and aging: the potential role of iron. **Hormones (Athens)**, v. 7, n. 2, p. 114-22, 2008.
- GAN, Q.; HUANG, J.; ZHOU, R.; NIU, J. et al. PPAR{gamma} accelerates cellular senescence by inducing p16INK4{alpha} expression in human diploid fibroblasts. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 13, p. 2235-45, 2008.
- GENKINGER, J. M.; PLATZ, E. A.; HOFFMAN, S. C.; COMSTOCK, G. W. et al. Fruit, vegetable, and antioxidant intake and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in a community-dwelling population in Washington County, Maryland. **Am J Epidemiol**, v. 160, n. 12, p. 1223-33, 2004.
- GIBLIN, W.; SKINNER, M. E.; LOMBARD, D. B. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. **Trends Genet**, v. 30, n. 7, p. 271-286, 2014.
- GIBSON, A.; EDGAR, J. D.; NEVILLE, C. E.; GILCHRIST, S. E. et al. Effect of fruit and vegetable consumption on immune function in older people: a randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr**, v. 96, n. 6, p. 1429-36, 2012.

- GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Role of polyphenols in cell death control. **Nutr Neurosci**, v. 15, n. 3, p. 134-49, 2012.
- GIOVANNINI, S.; ONDER, G.; LIPEROTI, R.; RUSSO, A. et al. Interleukin-6, C-reactive protein, and tumor necrosis factor-alpha as predictors of mortality in frail, community-living elderly individuals. **J Am Geriatr Soc**, v. 59, n. 9, p. 1679-85, 2011.
- GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 12, p. 931-47, 2013.
- GOTO, M. Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? **Biosci Trends**, v. 2, n. 6, p. 218-30, 2008.
- HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods Enzymol**, v. 77, p. 218-31, 1981.
- HADDAD, J. J. Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and I κ B-alpha/NF-kappaB nuclear translocation and activation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 296, n. 4, p. 847-56, 2002.
- HAIGIS, M. C.; MOSTOSLAVSKY, R.; HAIGIS, K. M.; FAHIE, K. et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 941-54, 2006.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 312-22, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Bioscience Oxford, 2007.
- HAN, L.; ZHOU, R.; NIU, J.; MCNUTT, M. A. et al. SIRT1 is regulated by a PPAR γ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. 21, p. 7458-71, 2010.
- HANDA, S.; MARUYAMA, N.; ISHIGAMI, A. Over-expression of Senescence Marker Protein-30 decreases reactive oxygen species in human hepatic carcinoma Hep G2 cells. **Biol Pharm Bull**, v. 32, n. 10, p. 1645-8, 2009.
- HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, v. 48, n. 2, p. 422-7, 1972.
- HASEGAWA, Y.; SAWADA, M.; OZAKI, N.; INAGAKI, T. et al. Increased soluble tumor necrosis factor receptor levels in the serum of elderly people. **Gerontology**, v. 46, n. 4, p. 185-8, 2000.
- HAYASHIDA, S.; ARIMOTO, A.; KURAMOTO, Y.; KOZAKO, T. et al. Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPAR α in mice. **Mol Cell Biochem**, v. 339, n. 1-2, p. 285-92, 2010.
- HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 4, p. 199-218, 2014.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p.319-368.
- HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*. **Am J Physiol**, v. 271, n. 4 Pt 2, p. R918-25, 1996.

- HERRANZ, D.; MUNOZ-MARTIN, M.; CANAMERO, M.; MULERO, F. et al. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. **Nat Commun**, v. 1, p. 3, 2010.
- HIRSCHEY, M. D.; SHIMAZU, T.; JING, E.; GRUETER, C. A. et al. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. **Mol Cell**, v. 44, n. 2, p. 177-90, 2011.
- HODGE, A. M.; O'DEA, K.; ENGLISH, D. R.; GILES, G. G. et al. Dietary patterns as predictors of successful ageing. **J Nutr Health Aging**, v. 18, n. 3, p. 221-7, 2014.
- HOHN, A.; WEBER, D.; JUNG, T.; OTT, C. et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox Biol**, v. 11, p. 482-501, 2016.
- HOUTKOOPER, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 225-38, 2012.
- HOWITZ, K. T.; BITTERMAN, K. J.; COHEN, H. Y.; LAMMING, D. W. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, n. 6954, p. 191-6, 2003.
- HUANG, K.; CHEN, C.; HAO, J.; HUANG, J. et al. Polydatin promotes Nrf2-ARE anti-oxidative pathway through activating Sirt1 to resist AGEs-induced upregulation of fibronectin and transforming growth factor-beta1 in rat glomerular mesangial cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 399, p. 178-89, 2015.
- HUBBARD, B. P.; SINCLAIR, D. A. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, n. 3, p. 146-54, 2014.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1789, 2008.
- IBGE. **Tábua completa de mortalidade para o Brasil – 2015. Breve análise da evolução da mortalidade no Brasil**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro. 2016
- ISHIGAMI, A.; KONDO, Y.; NANBA, R.; OHSAWA, T. et al. SMP30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 315, n. 3, p. 575-80, 2004.
- JOANISSE, D. R.; STOREY, K. B. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. **Am J Physiol**, v. 271, n. 3 Pt 2, p. R545-53, 1996.
- JUNG, K. J.; LEE, E. K.; KIM, S. J.; SONG, C. W. et al. Anti-inflammatory activity of SMP30 modulates NF-kappaB through protein tyrosine kinase/phosphatase balance. **J Mol Med (Berl)**, 2014.
- JUNG, M.; TRIEBEL, S.; ANKE, T.; RICHLING, E. et al. Influence of apple polyphenols on inflammatory gene expression. **Mol Nutr Food Res**, v. 53, n. 10, p. 1263-80, 2009.
- KAEBERLEIN, M.; MCVEY, M.; GUARENTE, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. **Genes Dev**, v. 13, n. 19, p. 2570-80, 1999.
- KIM, J.; CHA, Y. N.; SURH, Y. J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutat Res**, v. 690, n. 1-2, p. 12-23, 2010.
- KIRKWOOD, T. B. Understanding the odd science of aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 437-47, 2005.
- KOHMAN, R. A.; CROWELL, B.; KUSNECOV, A. W. Differential sensitivity to endotoxin exposure in young and middle-age mice. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 3, p. 486-92, 2010.

- KONDO, Y.; INAI, Y.; SATO, Y.; HANDA, S. et al. Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 15, p. 5723-8, 2006.
- KONDO, Y.; MASUTOMI, H.; NODA, Y.; OZAWA, Y. et al. Senescence marker protein-30/superoxide dismutase 1 double knockout mice exhibit increased oxidative stress and hepatic steatosis. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 522-32, 2014.
- KURIYAMA, S.; SHIMAZU, T.; OHMORI, K.; KIKUCHI, N. et al. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. **JAMA**, v. 296, n. 10, p. 1255-65, 2006.
- LABAT-ROBERT, J.; ROBERT, L. Longevity and aging. Mechanisms and perspectives. **Pathol Biol (Paris)**, v. 63, n. 6, p. 272-6, 2015.
- LANZA, I. R.; SHORT, D. K.; SHORT, K. R.; RAGHAVAKAIMAL, S. et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging. **Diabetes**, v. 57, n. 11, p. 2933-42, 2008.
- LEBRASSEUR, N. K.; TCHKONIA, T.; KIRKLAND, J. L. Cellular Senescence and the Biology of Aging, Disease, and Frailty. **Nestle Nutr Inst Workshop Ser**, v. 83, p. 11-8, 2015.
- LEE, J. S.; WARD, W. O.; REN, H.; VALLANAT, B. et al. Meta-analysis of gene expression in the mouse liver reveals biomarkers associated with inflammation increased early during aging. **Mech Ageing Dev**, v. 133, n. 7, p. 467-78, 2012.
- LEENDERS, M.; SLUIJS, I.; ROS, M. M.; BOSHUIZEN, H. C. et al. Fruit and vegetable consumption and mortality: European prospective investigation into cancer and nutrition. **Am J Epidemiol**, v. 178, n. 4, p. 590-602, 2013.
- LEWIS, K. N.; MELE, J.; HAYES, J. D.; BUFFENSTEIN, R. Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity. **Integr Comp Biol**, v. 50, n. 5, p. 829-43, 2010.
- LI, S.; ZHAO, G.; CHEN, L.; DING, Y. et al. Resveratrol protects mice from paraquat-induced lung injury: The important role of SIRT1 and NRF2 antioxidant pathways. **Mol Med Rep**, v. 13, n. 2, p. 1833-8, 2016.
- LI, W.; GUO, Y.; ZHANG, C.; WU, R. et al. Dietary Phytochemicals and Cancer Chemoprevention: A Perspective on Oxidative Stress, Inflammation, and Epigenetics. **Chem Res Toxicol**, v. 29, n. 12, p. 2071-2095, 2016.
- LI, Y. N.; GUO, Y.; XI, M. M.; YANG, P. et al. Saponins from *Aralia taibaiensis* attenuate D-galactose-induced aging in rats by activating FOXO3a and Nrf2 pathways. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 320513, 2014.
- LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **J Food Sci**, v. 78 Suppl 1, p. A18-25, 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LO, Y. T.; CHANG, Y. H.; WAHLQVIST, M. L.; HUANG, H. B. et al. Spending on vegetable and fruit consumption could reduce all-cause mortality among older adults. **Nutr J**, v. 11, p. 113, 2012.
- LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn Rev**, v. 4, n. 8, p. 118-26, 2010.
- LUO, P.; DONG, G.; LIU, L.; ZHOU, H. The Long-Term Consumption of Ginseng Extract Reduces the Susceptibility of Intermediate-Aged Hearts to Acute Ischemia Reperfusion Injury. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144733, 2015.

- MALLIKARJUN, V.; SRIRAM, A.; SCIALO, F.; SANZ, A. The interplay between mitochondrial protein and iron homeostasis and its possible role in ageing. **Exp Gerontol**, v. 56, p. 123-34, 2014.
- MARIN, A. M.; SIQUEIRA, E. M.; ARRUDA, S. F. Minerals, phytic acid and tannin contents of 18 fruits from the Brazilian savanna. **Int J Food Sci Nutr**, v. 60 Suppl 7, p. 180-90, 2009.
- MASSIE, H. R.; AIELLO, V. R.; WILLIAMS, T. R. Inhibition of iron absorption prolongs the life span of *Drosophila*. **Mech Ageing Dev**, v. 67, n. 3, p. 227-37, 1993.
- MCCORD, J. M. Analysis of superoxide dismutase activity. **Curr Protoc Toxicol**, v. Chapter 7, p. Unit 7 3, 2001.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-55, 1969.
- MELIDOU, M.; RIGANAKOS, K.; GALARIS, D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 12, p. 1591-600, 2005.
- MERKSAMER, P. I.; LIU, Y.; HE, W.; HIRSCHEY, M. D. et al. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. **Ageing (Albany NY)**, v. 5, n. 3, p. 144-50, 2013.
- MICHELS, K. B.; GIOVANNUCCI, E.; JOSHIPURA, K. J.; ROSNER, B. A. et al. Fruit and vegetable consumption and colorectal cancer incidence. **IARC Sci Publ**, v. 156, p. 139-40, 2002.
- MICHISHITA, E.; PARK, J. Y.; BURNESKIS, J. M.; BARRETT, J. C. et al. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 10, p. 4623-35, 2005.
- MILLER, K. B.; HURST, W. J.; FLANNIGAN, N.; OU, B. et al. Survey of commercially available chocolate- and cocoa-containing products in the United States. 2. Comparison of flavan-3-ol content with nonfat cocoa solids, total polyphenols, and percent cacao. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 19, p. 9169-80, 2009.
- MILNE, J. C.; DENU, J. M. The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. **Curr Opin Chem Biol**, v. 12, n. 1, p. 11-7, 2008.
- MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A. D. C. G.; SILVA, A. L. A. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 3, p. 13, 2016.
- MONTI, D.; OSTAN, R.; BORELLI, V.; CASTELLANI, G. et al. Inflammaging and human longevity in the omics era. **Mech Ageing Dev**, 2016.
- MOREL, I.; LESCOAT, G.; COGREL, P.; SERGENT, O. et al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochem Pharmacol**, v. 45, n. 1, p. 13-9, 1993.
- MORGAN, M. J.; LIU, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. **Cell Res**, v. 21, n. 1, p. 103-15, 2011.
- MOTTA, M. C.; DIVECHA, N.; LEMIEUX, M.; KAMEL, C. et al. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. **Cell**, v. 116, n. 4, p. 551-63, 2004.
- MURAKAMI, A.; OHGASHI, H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. **Int J Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2357-63, 2007.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-8, 2000.

- NAMAS, R. A.; BARTELS, J.; HOFFMAN, R.; BARCLAY, D. et al. Combined in silico, in vivo, and in vitro studies shed insights into the acute inflammatory response in middle-aged mice. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67419, 2013.
- NASRIN, N.; KAUSHIK, V. K.; FORTIER, E.; WALL, D. et al. JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8414, 2009.
- NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 284, n. 20, p. 13291-5, 2009.
- NIU, Y.; NA, L.; FENG, R.; GONG, L. et al. The phytochemical, EGCG, extends lifespan by reducing liver and kidney function damage and improving age-associated inflammation and oxidative stress in healthy rats. **Aging Cell**, v. 12, n. 6, p. 1041-9, 2013.
- NORIEGA, L. G.; FEIGE, J. N.; CANTO, C.; YAMAMOTO, H. et al. CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. **EMBO Rep**, v. 12, n. 10, p. 1069-76, 2011.
- OBRENOVICH, M. E.; NAIR, N. G.; BEYAZ, A.; ALIEV, G. et al. The role of polyphenolic antioxidants in health, disease, and aging. **Rejuvenation Res**, v. 13, n. 6, p. 631-43, 2010.
- OKAZAKI, M.; IWASAKI, Y.; NISHIYAMA, M.; TAGUCHI, T. et al. PPARbeta/delta regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1. **Endocr J**, v. 57, n. 5, p. 403-13, 2010.
- OYEBODE, O.; GORDON-DSEAGU, V.; WALKER, A.; MINDELL, J. S. Fruit and vegetable consumption and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data. **J Epidemiol Community Health**, v. 68, n. 9, p. 856-62, 2014.
- PALACIOS, J. A.; HERRANZ, D.; DE BONIS, M. L.; VELASCO, S. et al. SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. **J Cell Biol**, v. 191, n. 7, p. 1299-313, 2010.
- PALOMINO, O.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P.; SLOWING, K.; CARRETERO, E. et al. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 870, n. 1-2, p. 449-51, 2000.
- PARK, J. K.; HONG, I. H.; KI, M. R.; CHUNG, H. Y. et al. Vitamin C deficiency increases the binucleation of hepatocytes in SMP30 knock-out mice. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 25, n. 11, p. 1769-76, 2010.
- PARK, S. K.; SEONG, R. K.; KIM, J. A.; SON, S. J. et al. Oligonol promotes anti-aging pathways via modulation of SIRT1-AMPK-Autophagy Pathway. **Nutr Res Pract**, v. 10, n. 1, p. 3-10, 2016.
- PARK, S. K.; TUCKER, K. L.; O'NEILL, M. S.; SPARROW, D. et al. Fruit, vegetable, and fish consumption and heart rate variability: the Veterans Administration Normative Aging Study. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 3, p. 778-86, 2009.
- PAZ, M.; GULLON, P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chem**, v. 172, p. 462-8, 2015.
- PEARSON, K. J.; BAUR, J. A.; LEWIS, K. N.; PESHKIN, L. et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. **Cell Metab**, v. 8, n. 2, p. 157-68, 2008.
- PENG, C.; WANG, X.; CHEN, J.; JIAO, R. et al. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 831841, 2014.
- PEREIRA, A. C.; DIONISIO, A. P.; WURLITZER, N. J.; ALVES, R. E. et al. Effect of antioxidant potential of tropical fruit juices on antioxidant enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. **Food Chem**, v. 157, p. 179-85, 2014.

- PEREZ, V. I.; BOKOV, A.; VAN REMMEN, H.; MELE, J. et al. Is the oxidative stress theory of aging dead? **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 10, p. 1005-14, 2009.
- PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochem Biophys**, v. 53, n. 2, p. 75-100, 2009.
- PFLUGER, P. T.; HERRANZ, D.; VELASCO-MIGUEL, S.; SERRANO, M. et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 28, p. 9793-8, 2008.
- PIETSCH, K.; SAUL, N.; MENZEL, R.; STURZENBAUM, S. R. et al. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. **Biogerontology**, v. 10, n. 5, p. 565-78, 2009.
- PIRINEN, E.; LO SASSO, G.; AUWERX, J. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 26, n. 6, p. 759-70, 2012.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, v. 97, p. 55-74, 2015.
- PORQUET, D.; CASADESUS, G.; BAYOD, S.; VICENTE, A. et al. Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. **Age (Dordr)**, v. 35, n. 5, p. 1851-65, 2013.
- PURUSHOTHAM, A.; SCHUG, T. T.; XU, Q.; SURAPUREDDI, S. et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. **Cell Metab**, v. 9, n. 4, p. 327-38, 2009.
- QIN, S.; HOU, D. X. Multiple regulations of Keap1/Nrf2 system by dietary phytochemicals. **Mol Nutr Food Res**, v. 60, n. 8, p. 1731-55, 2016.
- QIU, X.; BROWN, K.; HIRSHEY, M. D.; VERDIN, E. et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. **Cell Metab**, v. 12, n. 6, p. 662-7, 2010.
- QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.
- RAHMAN, S.; ISLAM, R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 11, 2011.
- RAJENDRASOZHAN, S.; YANG, S. R.; KINNULA, V. L.; RAHMAN, I. SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 177, n. 8, p. 861-70, 2008.
- RASTOGI, M.; OJHA, R. P.; SAGAR, C.; AGRAWAL, A. et al. Protective effect of curcuminoids on age-related mitochondrial impairment in female Wistar rat brain. **Biogerontology**, v. 15, n. 1, p. 21-31, 2014.
- RATTAN, S. I. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. **Free Radic Res**, v. 40, n. 12, p. 1230-8, 2006.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.
- REISMAN, S. A.; YEAGER, R. L.; YAMAMOTO, M.; KLAASSEN, C. D. Increased Nrf2 activation in livers from Keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. **Toxicol Sci**, v. 108, n. 1, p. 35-47, 2009.
- REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, 2010.

- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med**, v. 20, n. 7, p. 933-56, 1996.
- RICHERT, S.; WEHR, N. B.; STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. **Arch Biochem Biophys**, v. 397, n. 2, p. 430-2, 2002.
- ROSA, F. R. **Atividade Antioxidante de Frutos do Cerrado e Identificação de Compostos em *Bactris setosa* Mart., *Palmae* (Tucum-do-cerrado)**. 2013. 224 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasília.
- ROSA, F. R.; ARRUDA, A. F.; SIQUEIRA, E. M.; ARRUDA, S. F. Phytochemical Compounds and Antioxidant Capacity of Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart), Brazil's Native Fruit. **Nutrients**, v. 8, n. 3, 2016.
- SCHOTTKER, B.; SAUM, K. U.; JANSEN, E. H.; BOFFETTA, P. et al. Oxidative stress markers and all-cause mortality at older age: a population-based cohort study. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 70, n. 4, p. 518-24, 2015.
- SESTILI, P.; DIAMANTINI, G.; BEDINI, A.; CERIONI, L. et al. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. **Biochem J**, v. 364, n. Pt 1, p. 121-8, 2002.
- SHAH, A. S.; AHMED, M.; ALKREATHY, H. M.; KHAN, M. R. et al. Phytochemical screening and protective effects of *Trifolium alexandrinum* (L.) against free radical-induced stress in rats. **Food Sci Nutr**, v. 2, n. 6, p. 751-7, 2014.
- SHIH, P. H.; YEN, G. C. Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway. **Biogerontology**, v. 8, n. 2, p. 71-80, 2007.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am J Clin Nutr**, v. 62, n. 6 Suppl, p. 1315S-1321S, 1995.
- SIMÕES, C. C. D. S. **Relações entre as alterações históricas na dinâmica demográfica brasileira e os impactos decorrentes do processo do envelhecimento da população**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. 116
- SIN, T. K.; YUNG, B. Y.; SIU, P. M. Modulation of SIRT1-Foxo1 Signaling axis by Resveratrol: Implications in Skeletal Muscle Aging and Insulin Resistance. **Cell Physiol Biochem**, v. 35, n. 2, p. 541-52, 2015.
- SIQUEIRA, E. M.; ROSA, F. R.; FUSTINONI, A. M.; DE SANT'ANA, L. P. et al. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72826, 2013.
- SIQUEIRA, E. M. A.; MARIN, A. F. M.; DA CUNHA, M. S. B.; FUSTINONI, A. M. et al. Consumption of baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 427-433, 2012.
- SOERENSEN, M.; NYGAARD, M.; DATO, S.; STEVNSNER, T. et al. Association study of FOXO3A SNPs and aging phenotypes in Danish oldest-old individuals. **Aging Cell**, v. 14, n. 1, p. 60-6, 2015.
- SOMEYA, S.; YU, W.; HALLOWS, W. C.; XU, J. et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 802-12, 2010.
- SON, T. G.; ZOU, Y.; JUNG, K. J.; YU, B. P. et al. SMP30 deficiency causes increased oxidative stress in brain. **Mech Ageing Dev**, v. 127, n. 5, p. 451-7, 2006.
- SRIVIDHYA, R.; JYOTHILAKSHMI, V.; ARULMATHI, K.; SENTHILKUMARAN, V. et al. Attenuation of senescence-induced oxidative exacerbations in aged rat brain by (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 2, p. 217-23, 2008.

- ST-PIERRE, J.; DRORI, S.; ULDRY, M.; SILVAGGI, J. M. et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 397-408, 2006.
- STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Mol Aspects Med**, v. 24, n. 6, p. 345-51, 2003.
- STEFANSON, A. L.; BAKOVIC, M. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals. **Nutrients**, v. 6, n. 9, p. 3777-801, 2014.
- SULTANA, M. R.; BAGUL, P. K.; KATARE, P. B.; ANWAR MOHAMMED, S. et al. Garlic activates SIRT-3 to prevent cardiac oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diabetes. **Life Sci**, v. 164, p. 42-51, 2016.
- SUN, Y.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clin Chem**, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.
- SURH, Y. J.; KUNDU, J. K.; NA, H. K.; LEE, J. S. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. **J Nutr**, v. 135, n. 12 Suppl, p. 2993S-3001S, 2005.
- TAO, R.; COLEMAN, M. C.; PENNINGTON, J. D.; OZDEN, O. et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. **Mol Cell**, v. 40, n. 6, p. 893-904, 2010.
- THIMMULAPPA, R. K.; LEE, H.; RANGASAMY, T.; REDDY, S. P. et al. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. **J Clin Invest**, v. 116, n. 4, p. 984-95, 2006.
- THOMPSON, A. M.; WAGNER, R.; RZUCIDLO, E. M. Age Related Loss of SirT1 Expression Results in Dysregulated Human Vascular Smooth Muscle Cell Function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2014.
- THOPPIL, R. J.; BHATIA, D.; BARNES, K. F.; HAZNAGY-RADNAI, E. et al. Black currant anthocyanins abrogate oxidative stress through Nrf2-mediated antioxidant mechanisms in a rat model of hepatocellular carcinoma. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 12, n. 9, p. 1244-57, 2012.
- TISSENBAUM, H. A.; GUARENTE, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 227-30, 2001.
- VALENZANO, D. R.; TERZIBASI, E.; GENADE, T.; CATTANEO, A. et al. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. **Curr Biol**, v. 16, n. 3, p. 296-300, 2006.
- VASILOPOULOS, T.; KOTWAL, A.; HUISINGH-SCHEETZ, M. J.; WAITE, L. J. et al. Comorbidity and chronic conditions in the National Social Life, Health and Aging Project (NSHAP), Wave 2. **J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci**, v. 69 Suppl 2, p. S154-65, 2014.
- VERAS, R. P. **País jovem com cabelos brancos: a saúde do idoso no Brasil**. Rio de Janeiro: Relume Dumará, 1994.
- VIJG, J.; MASLOV, A. Y.; SUH, Y. Aging: a sirtuin shake-up? **Cell**, v. 135, n. 5, p. 797-8, 2008.
- VRHOVSEK, U.; RIGO, A.; TONON, D.; MATTIVI, F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 21, p. 6532-8, 2004.
- WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochem J**, v. 434, n. 3, p. 365-81, 2011.
- WEINERT, B. T.; TIMIRAS, P. S. Invited review: Theories of aging. **J Appl Physiol (1985)**, v. 95, n. 4, p. 1706-16, 2003.

WEISS, G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 18, n. 2, p. 183-201, 2005.

WHO. Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. Report of a WHO Study Group. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 797, p. 1-204, 1990.

_____. **Global Health and Aging. - What are the public health implications of global ageing?** World Health Organization. Geneva. 2017

WILSON, M. A.; SHUKITT-HALE, B.; KALT, W.; INGRAM, D. K. et al. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v. 5, n. 1, p. 59-68, 2006.

WU, Y. T.; WU, S. B.; WEI, Y. H. Roles of sirtuins in the regulation of antioxidant defense and bioenergetic function of mitochondria under oxidative stress. **Free Radic Res**, v. 48, n. 9, p. 1070-84, 2014.

XIONG, S.; SHE, H.; TSUKAMOTO, H. Signaling role of iron in NF-kappa B activation in hepatic macrophages. **Comp Hepatol**, v. 3 Suppl 1, p. S36, 2004.

XU, J.; HWANG, J. C.; LEES, H. A.; WOHLGEMUTH, S. E. et al. Long-term perturbation of muscle iron homeostasis following hindlimb suspension in old rats is associated with high levels of oxidative stress and impaired recovery from atrophy. **Exp Gerontol**, v. 47, n. 1, p. 100-8, 2012.

XU, J.; MARZETTI, E.; SEO, A. Y.; KIM, J. S. et al. The emerging role of iron dyshomeostasis in the mitochondrial decay of aging. **Mech Ageing Dev**, v. 131, n. 7-8, p. 487-93, 2010.

YAMAGUCHI, M. Role of regucalcin in maintaining cell homeostasis and function (review). **Int J Mol Med**, v. 15, n. 3, p. 371-89, 2005.

YAMAGUCHI, M.; IGARASHI, A.; UCHIYAMA, S.; SAWADA, N. Hyperlipidemia is induced in regucalcin transgenic rats with increasing age. **Int J Mol Med**, v. 14, n. 4, p. 647-51, 2004.

YANG, H.; YANG, T.; BAUR, J. A.; PEREZ, E. et al. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 1095-107, 2007.

YANG, Y.; FU, W.; CHEN, J.; OLASHAW, N. et al. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 11, p. 1253-62, 2007.

YU, W.; DITTENHAFFER-REED, K. E.; DENU, J. M. SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status. **J Biol Chem**, v. 287, n. 17, p. 14078-86, 2012.

YUAN, Y.; CRUZAT, V. F.; NEWSHOLME, P.; CHENG, J. et al. Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis. **Mech Ageing Dev**, v. 155, p. 10-21, 2016.

YUN, J. M.; CHIEN, A.; JIALAL, I.; DEVARAJ, S. Resveratrol up-regulates SIRT1 and inhibits cellular oxidative stress in the diabetic milieu: mechanistic insights. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 7, p. 699-705, 2012.

ZENG, L.; YANG, Y.; HU, Y.; SUN, Y. et al. Age-related decrease in the mitochondrial sirtuin deacetylase Sirt3 expression associated with ROS accumulation in the auditory cortex of the mimetic aging rat model. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88019, 2014.

ZHANG, X.; SHU, X. O.; XIANG, Y. B.; YANG, G. et al. Cruciferous vegetable consumption is associated with a reduced risk of total and cardiovascular disease mortality. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 1, p. 240-6, 2011.

ZHAO, C.; SAKAGUCHI, T.; FUJITA, K.; ITO, H. et al. Pomegranate-Derived Polyphenols Reduce Reactive Oxygen Species Production via SIRT3-Mediated SOD2 Activation. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 2927131, 2016.

ZHOU, X.; CHEN, M.; ZENG, X.; YANG, J. et al. Resveratrol regulates mitochondrial reactive oxygen species homeostasis through Sirt3 signaling pathway in human vascular endothelial cells. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1576, 2014.

CAPÍTULO 3

3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo sugerem mais evidências científicas de efeitos biológicos do consumo de tucum-do-cerrado. Observou-se que o consumo isolado do tucum-do-cerrado apresenta efeitos benéficos no balanço redox, por aumentar a atividade antioxidante enzimática, ativando e induzindo a via do Nrf2, e que a ingestão deste fruto pode estar relacionada a um efeito positivo na longevidade por aumentar os níveis da proteína SIRT1, embora não apresente efeitos imunomodulatórios. O tucum-do-cerrado também parece apresentar uma importante atividade antioxidante por promover melhora do balanço redox na presença de um potente agente oxidante, como o ferro, além de atenuar a inflamação e induzir a expressão de SIRT1 nesta situação estresse oxidativo.

Como no presente estudo foi utilizado um modelo com animais considerados adultos-jovens (seis meses de idade ao final do tratamento) e também não foram observadas diferenças em alguns marcadores de envelhecimento, estudos futuros devem investigar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado ao longo do curso da vida em modelos animais, a fim de se avaliar seus efeitos na taxa de sobrevivência e expectativa de vida destes. Nesse mesmo sentido, estudos *in vitro* são encorajados na tentativa de elucidar e identificar as vias e os compostos presentes no tucum-do-cerrado relacionados à ativação de vias relacionadas ao envelhecimento e à longevidade, como a via da SIRT1-Nrf2.

Além disso, por atenuar o estresse oxidativo e inflamação, o consumo deste fruto pode também estar associado à prevenção e/ou inibição da progressão de doenças crônicas associadas a estes dois processos. Deste modo, a investigação dos efeitos do consumo de tucum-do-cerrado em modelos de doenças crônicas, bem como ensaios clínicos que envolvam o consumo de tucum-do-cerrado nestas situações, devem ser realizados.

3.2. ANEXO - Certificado da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA)

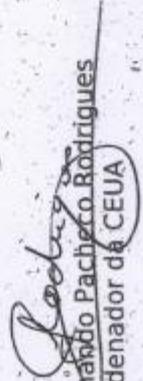

Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética no Uso Animal

DECLARAÇÃO

Brasília, 11 de abril de 2014.



Declaramos que o projeto intitulado "EFEITO DO CONSUMO DE TUCUM (BACTRIS SETOSA MART.) SOBRE MARCADORES DO ENVELHECIMENTO E DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS SUPLEMENTADOS COM FERRO", UnBDOC n.º 20855/2014, sob responsabilidade da Professora Sandra Fernandes Arrudá foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


 Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues
 Coordenador da CEUA



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.