

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DA ASTAXANTINA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DESORDEM METABÓLICA INDUZIDO POR
METILGLIOXAL.**

RÊNATA CRISTINA BERTOLINI GOBBO

PORTO ALEGRE-RS

2022

RÊNATA CRISTINA BERTOLINI GOBBO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DA ASTAXANTINA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DESORDEM METABÓLICA INDUZIDO POR
METILGLIOXAL.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto de Oliveira

PORTO ALEGRE-RS

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Gobbo, Renata Cristina Bertolini
INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DA ASTAXANTINA
EM MODELO EXPERIMENTAL DE DESORDEM METABÓLICA
INDUZIDO POR METILGLIOXAL. / Renata Cristina
Bertolini Gobbo. -- 2022.
83 f.
Orientador: Marcos Roberto de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Astaxantina. 2. Mitocôndria. 3. Hemeoxigenase-1.
4. Antioxidante. 5. Anti-inflamatória. I. de Oliveira,
Marcos Roberto, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus por ter me sustentado em todo momento, pois enfrentar me coloquei no desafio de realizar um mestrado longe da minha família. Logo, a pandemia não foi nada fácil. A princípio eram só 30 dias, depois 3 meses e por fim se passaram 2 anos. Ainda assim, sou brasileira que não desiste nunca, mesmo em situações difíceis. Agradeço minha mãe Rose, minha irmã Márcia e meu namorado Luís. Eles foram fundamentais na construção desta caminhada educacional, pois as noites de choro no travesseiro, apenas eles estiveram ali.

Agradeço ao meu orientador Dr Marcos por me suportar e orientar a medida do possível. A caminhada foi dura para ele também, afinal quem espera orientar em meio a pandemia, com diversas dificuldades desconhecidas? Ainda, agradeço ao programa de pós-graduação que me atendeu prontamente a todos os e-mails e chamadas. Agradeço aos verdadeiros mestres que me ensinaram e sem discriminação me auxiliaram neste percurso, em especial professora Larissa Bobermin. E, agradeço a CAPES que me financiou nesses 2 anos, dando a oportunidade de ser bolsista em um momento tão difícil economicamente.

Por fim, agradeço a minha família postiça Jerusa, Joeder, Neidi, Manu, Auria, Jucelino, Auriene, Adriel, vocês foram indispensáveis neste processo racional de subir mais um degrau acadêmico. Agradeço a minha rede de amizades, Merielle Messias, Jadyellen Rondon, Yasmin Figueiredo e Darling Lourenço, que foram simplesmente sensacionais, com certeza, sem vocês esse “rolê” não teria dado certo. Gente, muito obrigada!

SUMÁRIO

PARTE I:	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE BIOLOGIA REDOX.....	14
2.1 Pró-oxidantes.....	15
2.2 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio	18
2.3 Defesas antioxidantes.....	21
3. FISILOGIA MITOCONDRIAL.....	28
4. CONSEQUENCIAS DA SUPERPRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS.....	30
4.1 Doenças relacionadas ao desequilíbrio redox e inflamação	31
5. METILGLIOXAL	34
6. MOLÉCULAS BIOATIVAS POTENCIALMENTE CITOPROTETORAS	36
6.1 Astaxantina	37
7. OBJETIVOS	42
7.1 Objetivo geral.....	42
7.2 Objetivos específicos	42
PARTE II:	43
1. Metodologia.....	44
1.1 Materiais	44
1.2 Cultivo celular	44
1.3 Tratamentos químicos	44
1.4 Viabilidade celular e citotoxicidade	45
1.5 Isolamento mitocondrial	46
1.6 Quantificação dos níveis de ATP	46

1.7 Detecção da produção de espécies reativas	47
1.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	47
1.9 Detecção dos níveis de malondialdeído (MDA), de proteínas carboniladas e análise do estado redox de grupos sulfidril proteicos	48
1.10 Nível de citocinas pró-inflamatórias	49
1.11 Atividade da HO-1	49
1.12 Análises estatísticas	49
2. RESULTADOS	50
PARTE III:	60
1. DISCUSSÃO	61
2. CONCLUSÃO	71
3. PERSPECTIVAS FUTURAS	72
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	73

PARTE I:
Introdução e Objetivos

RESUMO

Astaxantina (AST), uma xantofila, tem sido vista como uma molécula citoprotetora em diferentes modelos experimentais. AST é uma potente indutora da enzima hemeoxigenase-1 (HO-1), a qual está envolvida na degradação do heme, gerando monóxido de carbono (CO), íons de ferro livres e biliverdina (BV). Biliverdina redutase (BVR) converte BV em bilirrubina (BR). CO, BV e BR podem induzir efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios em determinados tipos celulares. Metilglioxal (MG), um dicarbonil reativo, é um subproduto da glicólise e da degradação de certos aminoácidos, dentre outras moléculas. Ainda, MG é um contaminante na água, no solo e no ar. MG induz a produção de espécies reativas direta e indiretamente. Além disso, MG causa disfunção mitocondrial. As mitocôndrias são as principais fontes de adenosina trifosfato (ATP) em células animais. Por outro lado, as mitocôndrias são um importante sítio de produção de espécies reativas. Assim, dano mitocondrial pode resultar em colapso bioenergético e desequilíbrio redox. De fato, MG induz estresse oxidativo, falência bioenergética e inflamação em células humanas. No presente trabalho, investigamos se um pré-tratamento com AST atenuaria os efeitos causados por MG em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. AST a 5 – 40 μ M foi administrada às células por 24 h antes da exposição ao MG por 24 h adicionais. Analisamos ambos os parâmetros celulares e mitocondriais nesse modelo experimental. Encontramos que AST a 20 μ M preveniu o desequilíbrio redox e o colapso bioenergético nas células expostas ao MG. AST estimulou a atividade de HO-1 e a inibição desta enzima por protoporfirina-IX de zinco (ZnPP-IX) suprimiu os efeitos promovidos por AST nas mitocôndrias das células expostas ao MG. Além disso, AST preveniu o aumento induzido por MG nos níveis de interleucina-1 β (IL-1 β) e de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), marcadores de inflamação, nas células expostas ao ZnPP-IX. Um co-tratamento com molécula-2 liberadora de monóxido de carbono (CORM-2) ou BR reduziu o impacto de MG na viabilidade das células SH-SY5Y. Assim, AST preveniu o dano celular, o colapso mitocondrial e a inflamação por um mecanismo associado com HO-1 em células expostas ao MG. Pesquisas adicionais são necessárias para analisar o mecanismo exato pelo qual AST promoveu citoproteção contra MG.

Palavras-chave: Astaxantina; Mitocôndria; Hemeoxigenase-1; Antioxidante; Anti-inflamatória.

ABSTRACT

Astaxanthin (AST), a xanthophyll, has been viewed as a cytoprotective molecule in different experimental models. AST is a potent inducer of the enzyme heme oxygenase-1 (HO-1), which is involved in the degradation of heme, generating carbon monoxide (CO), free iron ions, and biliverdin (BV). Biliverdin reductase (BVR) converts BV into bilirubin (BR). CO, BV, and BR can induce antioxidant and anti-inflammatory effects in certain cell types. Methylglyoxal (MG), a reactive dicarbonyl, is a by-product of glycolysis of the degradation of certain amino acids, among other molecules. Otherwise, MG is a contaminant in water, soil, and air. MG induce the production of reactive species by direct and indirect routes. Moreover, MG causes mitochondrial dysfunction. Mitochondria are a major source of adenosine triphosphate (ATP) in animal cells. On the other hand, mitochondria are an important site of reactive species production. Thus, mitochondrial damage may result in bioenergetics collapse and redox impairment. In fact, MG induces oxidative stress, bioenergetics failure, and inflammation in human cells. In the present work, we investigated whether a pre-treatment with AST would attenuate the effects caused by MG in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells. AST at 5 – 40 μ M was administrated to the cells for 24 h prior to an exposure to MG for additional 24 h. We analyzed both cellular and mitochondrial parameters in this experimental model. We found that AST at 20 μ M prevented the redox impairment and bioenergetic collapse in the cells exposed to MG. AST stimulated HO-1 activity and inhibition of this enzyme by zinc protoporphyrin-IX (ZnPP-IX) suppressed the effects promoted by AST on the mitochondria of the cells exposed to MG. Furthermore, AST prevent the MG-induced increase in the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), markers of inflammation, in the cells exposed to ZnPP-IX. A co-treatment with carbon monoxide releasing molecule-2 (CORM-2) or BR reduced the impact of MG on the viability of the SH-SY5Y cells. Thus, AST prevented the cellular impairment, mitochondrial collapse, and inflammation by a mechanism associated with HO-1 in the cells exposed to MG. Further research is necessary to analyze the exact mechanism by which AST promoted cytoprotection against MG.

Keywords: Astaxanthin; Mitochondria; Heme oxygenase-1; Antioxidant; Anti-inflammatory.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido Carnósico
AG	Aminoguanidina
AGES	Produtos Finais da Glicação Avançada
Apaf-1	Protease fator 1 de ativação de apoptose
AST	Astaxantina
ATP	Adenosina Trifosfato
BR	Bilirrubina
BV	Biliverdina
BVR	Biliverdina Redutase
CAT	Catalase
CO	Monóxido de Carbono
CORM-2	Molécula-2 liberadora de monóxido de Carbono
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e Zinco
DCFH-CA	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína
DMSO	Dimetilsufóxido
ERE	Espécies reativas de enxofre
ERO	Espécies reativas de Oxigênio
ERN	Espécies reativas de Nitrogênio
ETC	Cadeia transportadora de elétrons
GSH	Glutaciona
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSH-Rd	Glutaciona redutase
GSSG	Glutaciona dissulfeto
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HO	Hemeoxigenase
HNO ₂	Ácido nitroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO ₂ •	Radical hidroperoxil
IL-1 β	Interleucina 1- β
IMM	Membranas mitocondriais internas
IMS	Espaço intermembranar

JC-1	Iodeto de tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LDH	Lactato desidrogenase
L•	Radical lipídico
LO•	Radical alcooxila
LOO•	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MAO	Monoamina oxidase
MDA	Malondialdeído
MG	Metilglioxal
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina.
NH ₄ ⁺	Íon amônio
NO•	Radical óxido nítrico
NO ₂ •	Radical nitritos
NO ₃ •	Radical nitratos
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
NOS	Óxido nítrico sintase
NRF2	Fator nuclear eritróide 2
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ •	Oxigênio singleto
O ₂ • ⁻	Radical anion superóxido
OMM	Membrana mitocondrial externa
ONOO•	Radical peróxinitritos
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
PSM	Partículas submitocondriais
SFN	Sulforafano
SOD	Superóxido dismutase
SSAO	Aminoxidase sensível a semicarbazida
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UDP	Uridina difosfato glicosiltransferase
ZnPP-IX	Protoporfirina-IX de zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Redução tetravalente de O ₂ .	19
Figura 2: Reações de formação de espécies reativas	20
Figura 3: Resumo da ação das enzimas na eliminação das espécies reativas de oxigênio.	24
Figura 4: Conversão do grupo heme em biliverdina	25
Figura 5: Molécula de Astaxantina e seus isômeros	38
Figura 6: Efeitos da astaxantina (AST) e ou metilglioxal (MG) na viabilidade celular.	50
Figura 7: Confirmação do efeito protetor de AST de 20 µM quando exposta ao MG.	51
Figura 8: Ensaio de integridade de membrana.	51
Figura 9: Ensaio de peroxidação lipídica (A) e de níveis de ATP (B)	52
Figura 10: Ensaio da atividade de HO-1 em presença de AST.	53
Figura 11: Ensaio de fluorescência de DCF.	54
Figura 12: Ensaio de Peroxidação lipídica (A) e carbonilação de proteínas (B).	55
Figura 13: Oxidação do grupo tiol.	55
Figura 14: Ensaio de potencial de membrana (A) e análise dos níveis de ATP (B) observando o possível envolvimento de HO-1.	56
Figura 15: Ensaio de citocinas pró-inflamatórias IL-1β (A) e TNF-α (B).	57
Figura 16: Ensaio de viabilidade das células SH-SY5Y com CORM-2 e BR antes da exposição ao MG.	58
Figura 17: Ensaio de níveis de ATP em moléculas bioativas na presença de MG.	59
Figura 18: Ensaio de viabilidade das células SH-SY5Y na presença de moléculas bioativas expostas ao MG.	59

1. INTRODUÇÃO

A alimentação diversificada e rica para além dos micronutrientes essenciais vem sendo difundida por diversos especialistas de modo a agregar a saúde dos indivíduos, pois, diferentes alimentos contêm compostos com atividades anti-inflamatórias e antioxidantes. Assim, os produtos naturais se destacam na literatura por efeitos benéficos, contribuindo para o desenvolvimento de vários medicamentos. A astaxantina é uma biomolécula marinha de cor vermelho-alaranjada, com promissor potencial farmacológico e terapêutico, atualmente utilizada como imunomoduladora (Higuer-Ciapara et al., 2006). Ainda, pesquisas indicam que essa molécula bioativa possui excelente capacidade antioxidante, através da diminuição do estresse oxidativo (Galasso et al., 2018; Niu et al., 2018).

A oxidação é processo natural e necessário do metabolismo humano, contudo, quando ocorre de modo desproporcional, pode causar danos irreversíveis. O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a geração de espécies oxidantes e atividade dos sistemas antioxidantes, causando sobrecarga no organismo. As fontes do estresse oxidativo podem ser por meio de pró-oxidantes endógenos, e ou, exógenos. Os efeitos dos pró-oxidantes tendem a serem nocivos devido ao excesso de danos oxidativos causados em diversas partes do corpo. Assim, um processo inflamatório pode advir do demasiado dano oxidativo, pela disfunção dos processos fisiológicos (Hussain et al., 2016).

O metilglioxal é um pró-oxidante oriundo da via da glicólise, majoritariamente endógeno, com capacidade de causar neurotoxicidade e induzir um processo inflamatório crônico (Pun e Murphy, 2012). O excesso de metilglioxal no organismo pode induzir a produção de espécies oxidantes e ocasionar a disfunção mitocondrial.

A mitocôndria é a principal fonte endógena de geração das espécies oxidantes, que em condições metabólicas normais o sistema antioxidante fornece condições necessárias para suprimir os efeitos deletérios. No entanto, quando há circunstâncias anormais, causa o estresse oxidativo e pode acarretar a morte celular (Trachootham et al., 2008). Assim, muitas moléculas bioativas são estudadas afim de inibir o dano oxidativo causado por metilglioxal. Desta forma, o intuito desse trabalho foi investigar o efeito protetor da astaxantina em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas ao metilglioxal.

2. REVISÃO DE BIOLOGIA REDOX

As reações de oxirredução, ou reações redox acontecem em todo organismo humano, originando diferentes moléculas com características oxidantes e antioxidantes, e com propriedades de perda ou ganho de elétrons. A necessidade da homeostase redox para a vida é importante assim como o controle de pH. Essas reações são fundamentais pois são utilizados na sinalização redox e mecanismos de controle redox (Sies et al., 2017).

Ao perturbar a homeostase redox, o sistema entra em um processo de estresse oxidativo, conceituado por Sies et al (2017) como o desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, prevalecendo as oxidantes, podendo acarretar danos celulares. O desequilíbrio redox pode ser classificado de acordo com sua intensidade. Assim, pode acontecer o “eustress” oxidativo, quando o estresse é fisiológico, com o intuito benéfico; até o “distress” oxidativo, em que o estresse é tóxico e excessivo (Sies et al., 2017).

O estresse oxidativo pode advir também do desequilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes, afetando o estado redox da célula. Os efeitos pró-oxidantes dependem da concentração da substância, assim como sua classificação, haja visto que, existem diferentes mecanismos comuns para o desenvolvimento do estresse oxidativo.

2.1 Pró-oxidantes

Os pró-oxidantes são qualquer endobiótico ou xenobiótico que induz estresse oxidativo pela inibição de antioxidantes ou pela geração de espécies reativas (Rahal et al., 2014). As espécies reativas possuem alta reatividade e podem ser classificadas por: espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN), enxofre (ERE), carbono, cloro e metais de transição. Elas são divididas entre radicais livres e compostos não radicalares, diferenciados pelo radical formado quando o elétron é desemparelhado nos orbitais mais externo (Martelli e Nunes, 2014).

Os pró-oxidantes podem ser classificados conforme as suas fontes, sendo estes: exógenos, através de patógenos, drogas, toxicantes, clima e ingredientes dietéticos; endógenos, por meio dos metabólitos endógenos, fluxo de íons, drogas metabólicas e algumas organelas (Rahal et al., 2014).

2.1.1 Pró-oxidantes fisiológicos

Os pró-oxidantes fisiológicos são parte do próprio organismo com capacidade de oxidar moléculas alvo, induzindo a formação moléculas reativas e tem origem nas mitocôndrias e peroxissomos, assim como a enzima monoamina oxidase (MAO) (Cerqueira; Medeiros; Ohara, 2007). Além disso, é observado a produção aumentada

dessas espécies reativas durante a inflamação metabólica. O potencial deletério da ação do pró-oxidante pode variar conforme a capacidade de produção das fontes geradoras de espécies reativas (Barbosa, 2010).

A MAO é uma enzima que possui expressão variável conforme a espécie e o tecido, contendo isoforma MAO-A e MAO-B. A MAO possui papel fisiológico relacionado ao metabolismo de neurotransmissores monoaminérgicos, protegendo os neurônios de amins exógenas, prevenindo ações de amins endógenas e regulando o conteúdo de amins intracelulares. No entanto, a expressão anormal de MAO está relacionada a uma fonte constante de geração de H_2O_2 e conseqüentemente ocasionando estresse oxidativo, assim sendo um potencial pró-oxidante (Sturza et al., 2019).

O peroxissomo é uma organela responsável por vários processos metabólicos, incluindo a degradação de ácidos graxos, formação e eliminação em quantidade significativa de espécies reativas de oxigênio, principalmente peróxido de hidrogênio, produto que nomeia a organela (Marzzoco e Torres, 2015). Ela também pode funcionar como um compartimento de sinalização intracelular e desenvolvimento celular (Titorenko e Terlecky, 2010). As espécies reativas são produzidas pela enzima xantina oxidase e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) redutase, que aceita um elétron dentro do peroxissomo, doa para o citocromo b5 e os utilizam para a redução de várias substâncias, ou formar radical superóxido (Sarniak et al., 2016). Caso essas moléculas reativas não sejam dismutadas pelo sistema peroxissomal, acarretam dano celular.

2.1.1 Pró-oxidantes patológicos

Os pró-oxidantes patológicos são substâncias externas que ao serem expostas ao organismo são capazes de gerar espécies reativas. Diversas são as fontes dos pró-oxidantes patológicos, dentre eles os metais pesados, drogas em geral, toxicantes e alimentos em excesso. O dano oxidativo advindo desses patógenos pode ocasionar a ruptura de membrana, inativação enzimática e até a morte celular. Além disso, esses efeitos tóxicos podem desenvolver doenças inflamatórias, degenerativas e crônicas (Cerqueira; Medeiros; Ohara, 2007).

O alumínio é um metal xenobiótico, que desde a revolução industrial todos os seres vivos se tornaram suscetíveis as diversas fontes de exposição, desde vacinas à dieta (Lima et al., 2020). No entanto, o excesso desse metal pode causar neurotoxicidade devido a geração de espécies reativas de oxigênio, acarretando danos a síntese do DNA, instabilidade gênica, alterando a expressão genica e induzindo apoptose (Sanajou et al., 2021; Ullah et al., 2021). Alguns estudos epidemiológicos sobre a exposição do alumínio ao longo prazo indicam vários distúrbios neurológicos, incluindo doença de Parkinson (Ullah et al., 2021).

A obesidade é uma doença que cresce gradativamente, um importante fator de risco e está associada a inúmeras doenças crônicas. Em pessoas obesas, as lesões oxidativas causadas por hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperlipidemia são fatores que interferem em sua vulnerabilidade, corroborando para aumento de comorbidades, destacando a inflamação crônica, defesas antioxidantes inadequadas e níveis elevados de lipídios. Assim, há necessidade metabólica de maior consumo de oxigênio. No entanto, o excesso de lipídios plasmáticos acaba não sofrendo oxidação

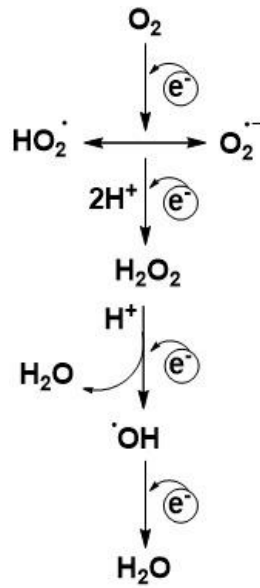
na mitocôndria, e ocasionam a produção de peroxidação lipídica, resultando em dano celular e disfunção mitocondrial (Schöler; Zavarize; Bock, 2016; França et al., 2013).

2.2 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

As espécies reativas de oxigênio são formadas por uma reação de dismutação enzimática na molécula de O_2 , através da redução tetravalente (Figura 1), aceitando quatro elétrons no decorrer do seu processo, produzindo ao final água (H_2O) e neutralizando a reatividade das espécies formadas. Entre as principais formas de ERO distribuem-se em radicais: radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$); radical hidroxil ($\bullet OH$); radical hidroperóxil (HO_2^{\bullet}), e não radicais: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (O_2^*) (Barreiros et al., 2006).

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é formado na respiração mitocondrial, durante a produção de ATP, pois se faz necessário uma grande quantidade de O_2 . No decorrer da cadeia transportada de elétrons (ETC), a redução de O_2 pode ocorrer nos complexos I e III e assim gerar $O_2^{\bullet-}$. Ao longo da ETC, $O_2^{\bullet-}$ é capaz de reagir com algumas enzimas mitocondriais, como α -cetoglutarato desidrogenase e aconitase, conduzindo a inibição do ciclo do ácido cítrico (Sies et al., 2017). $O_2^{\bullet-}$ é o radical mais potente em relação ao dano celular, pois atua em praticamente todas as células aeróbicas como um agente redutor. As enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase são também redutoras de O_2 em processos biológicos específicos, como no metabolismo das purinas, o caso da xantina (Vasconcelos et al., 2007).

Figura 1: Redução tetravalente de O_2 .



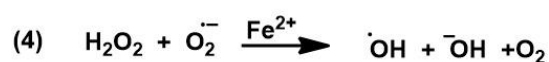
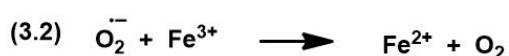
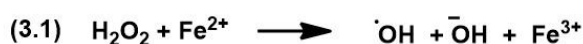
Fonte: Adaptado de Ferreira; Matsubara, 1997.

A dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ ocorre em duas etapas, catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD): em pH fisiológico na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio. No entanto, adição do elétron pode produzir $O_2^{\bullet-}$ que é uma base fraca cujo seu ácido conjugado é o peróxido de hidrogênio, formando O_2 (Barreiros et al., 2006).

O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa não radicalar, sendo assim não contém elétron desemparelhado (Figura 2), sendo formado por enzimas oxidases, ou por meio da β -oxidação de ácidos graxos. O H_2O_2 é capaz de atravessar membranas biológicas, e enquanto um agente oxidante, é capaz de produzir radical hidroxila por meio de reações com metais de transição. Os metais mais suscetíveis de formarem este produto são Cu^+ e Fe^{2+} , pois estão mais biodisponíveis no organismo, como por exemplo o ferro complexado a proteína de armazenamento (ferritina, proteína que armazena o ferro) e de transporte (transferrina proteína que transporta o ferro no sangue para todo o corpo). A reação de Fenton (3.1) é caracterizada pela redução de

Fe^{2+} a Fe^{3+} , na qual H_2O_2 reage com Fe^{2+} , gerando radical hidroxila. Esta reação pode ser acelerada na presença de radical ânion superóxido (3.2). Ademais, Fe^{2+} pode ser utilizado como catalizador da reação entre H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$, sendo denominada de reação de Haber-Weiss (4). A enzima catalase decompõe peróxido de hidrogênio em oxigênio em água (Barreiros et al., 2006).

Figura 2: Reações de formação de espécies reativas



Fonte: Adaptada de Barreiros et al., 2006.

O radical hidroxila é tido como a espécie mais reativa do sistema biológico, pois pode ser combinado rapidamente com metais e com outros radicais, formado pela reação com metais e pela homólise da água através da radiação. Este radical pode causar dano ao DNA, por meio do metal de transição, acarretando modificações nas bases nitrogenadas e provocando mutação ou inativação do DNA. Outros danos de OH^{\bullet} são em proteínas e aminoácidos por perda de atividade, e ainda em lipídios, membrana mitocondrial e carioteca (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A espécie reativa de nitrogênio é caracterizada por ser outro radical presente no estresse oxidativo, dentre eles incluem-se o radical óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), radical nitrito (NO_2^{\bullet}), radical nitrato (NO_3^{\bullet}) e peroxinitrito (ONOO^{\bullet}). O NO^{\bullet} é abundante e atua na sinalização celular, pode ser produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), molécula de oxigênio, L-arginina e NADPH, formando L-citrulina, NADP^+ . A formação de ONOO^{\bullet} é por meio da reação de NO^{\bullet} com $\text{O}_2^{\bullet-}$, sendo um agente oxidante que ocasiona hidroxilação e

nitração em moléculas aromáticas. NO_3^\bullet pode se transformar em NO_2^\bullet , reagindo com ácidos do estômago formando HNO_2 , que também é possível ser formado através da reação entre água e N_2O_3 (Barreiros et al., 2006).

O radical óxido nítrico foi descrito como um vasodilatador e uma molécula importante para o sistema circulatório. Contudo, produtos oxidativos do óxido nítrico foram observados em macromoléculas e proteínas, causando danos (Adams et al., 2015). HNO_2 promove a desaminação das bases do DNA que possuem grupo NH_2 livre. ONOO^\bullet através de reações secundárias formam agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos e as bases do DNA, assim também, foi demonstrado que peroxinitrito leva apoptose (Adams et al., 2015; Barreiros et al., 2006).

Desta forma, as espécies reativas podem ser favoráveis por serem moléculas sinalizadoras, bem como, serem moléculas que auxiliam na deterioração do organismo. Assim, dependente do estímulo e de sua fonte, as moléculas reativas originam-se dos pró-oxidantes. De forma a suprimir o efeito nocivo das espécies reativas, o organismo utiliza as defesas antioxidantes para propor um retardo na oxidação de macromoléculas.

2.3 Defesas antioxidantes

As células possuem sistemas de dispersão de radicais livres, definido por enzimas, antioxidantes de baixa massa molecular e proteínas desacopladoras, com o intuito de minimizar a produção dos radicais na ETC. As defesas antioxidantes são eficazes contra os efeitos nocivos das ERO em condições normais do metabolismo (Marzzoco e Torres, 2015). A defesa antioxidante é encontrada em baixa

concentração quando comparado ao substrato oxidável, com capacidade de desacelerar ou regenerar a oxidação do substrato.

O sistema antioxidante demanda um gasto de energia específico e necessita de modo intrínseco do metabolismo glicolítico. Com isso, indivíduos com deficiência de enzimas glicolíticas, tal como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) aumentam a vulnerabilidade ao estresse oxidativo (Brás, 2017) e diminui assim a eficiência dos antioxidantes.

Os antioxidantes podem ser caracterizados como enzimáticos e não enzimáticos, e oferecem uma proteção divididas em: prevenção, interceptação e reparo. A prevenção trata-se de evitar o estresse oxidativo, que vai desde as enzimas a serem projetadas para evitar liberar os radicais, ao cuidado de minimamente expor a radiação solar. Interceptação é ao serem formados os radicais, sistemas enzimáticos e não enzimáticos, robustos mantém o nível fisiológico. O reparo ocorre quando há danos moleculares, assim estão sujeitos a reparação através dos antioxidantes (Sies et al., 2017). Os sistemas antioxidantes atuam em duas linhas específicas de defesa: a detoxificação do agente antes da lesão e a reparadora pós lesão. Ambas possuem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Halliwell e Gutteridge, 2015).

2.3.1 Antioxidantes enzimáticos

As enzimas antioxidantes da linha detoxificadora são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GSH-Px) e heme-oxigenase-1 (HO-1) que atua indiretamente. Assim, são os primeiros a agir quando há necessidade de inativar os malefícios causados pelas espécies reativas. As enzimas antioxidantes se

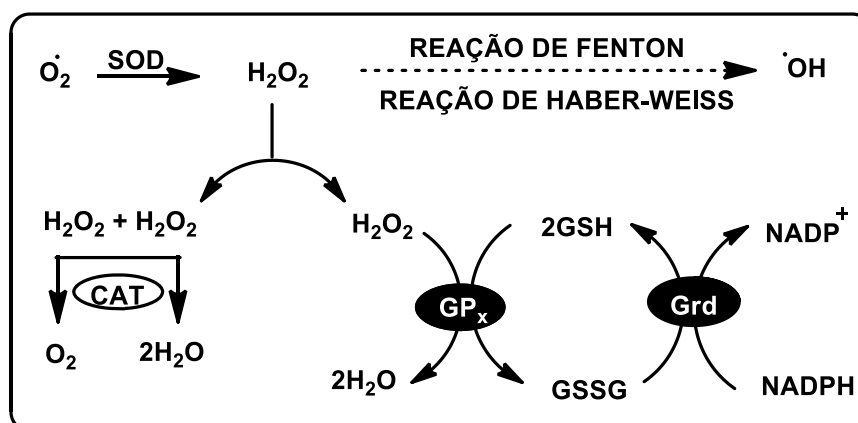
integram em um sistema com o intuito de promover a manutenção do equilíbrio com as espécies reativas formadas (Figura 2).

A SOD possui diferentes grupos prostéticos em sua composição, sendo nos eucariontes duas isoformas: cobre/zinco-SOD (Cu/Zn-SOD), encontradas no citosol, núcleo, lisossoma e espaço intermembranar (IMS); e Mn-SOD situada na mitocôndria. Esta enzima catalisa a reação que converte $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O , e permite a retirada deste radical mesmo em baixas concentrações (Halliwell e Gutteridge, 2015). SOD pode ser um agente de oxidação de um elétron, por $HO_2^{\bullet-}$, ou agente de redução de um elétron, se tornando uma enzima quimicamente versátil e específica na sinalização celular (Buettner, 2011).

A catalase (CAT) é uma heme proteína, localizada no citoplasma e peroxissoma. O papel da CAT é reduzir H_2O_2 em H_2O e O_2 , e sua função depende de NADPH. Na redução de H_2O_2 , NADPH atua como uma coenzima doadora de hidrogênio em uma síntese redutora e protege CAT do dano oxidativo (Barreiros et al.; 2006; Marzzoco e Torres, 2015). Essa reação catalisada por CAT também necessita de uma peroxidase com grupamento heme ligado ao ferro para que ocorra a dismutação completa. No cérebro os níveis da enzima catalase é baixo (Halliwell, 2006).

A enzima GSH-Px é encontrada no citosol e na mitocôndria, e pode ser dependente ou independente de selênio. Esta enzima é quem também decompõe H_2O_2 a H_2O e tem como substrato glutathiona (GSH). GSH atua como um agente redutor e sua oxidação ocorre para glutathiona dissulfeto (GSSG) pela enzima GSH-Px e a reversão à GSH é feito pela enzima glutathiona redutase (GSH-Rd) (Halliwell e Gutteridge, 2015). GSH-Rd também é uma enzima dependente de NADPH, como um agente oxidante, pois GSH reduz e oxida NADPH (Huber et al., 2008).

Figura 3: Resumo da ação das enzimas na eliminação das espécies reativas de oxigênio.



Fonte: Adaptado Huber et al., 2008.

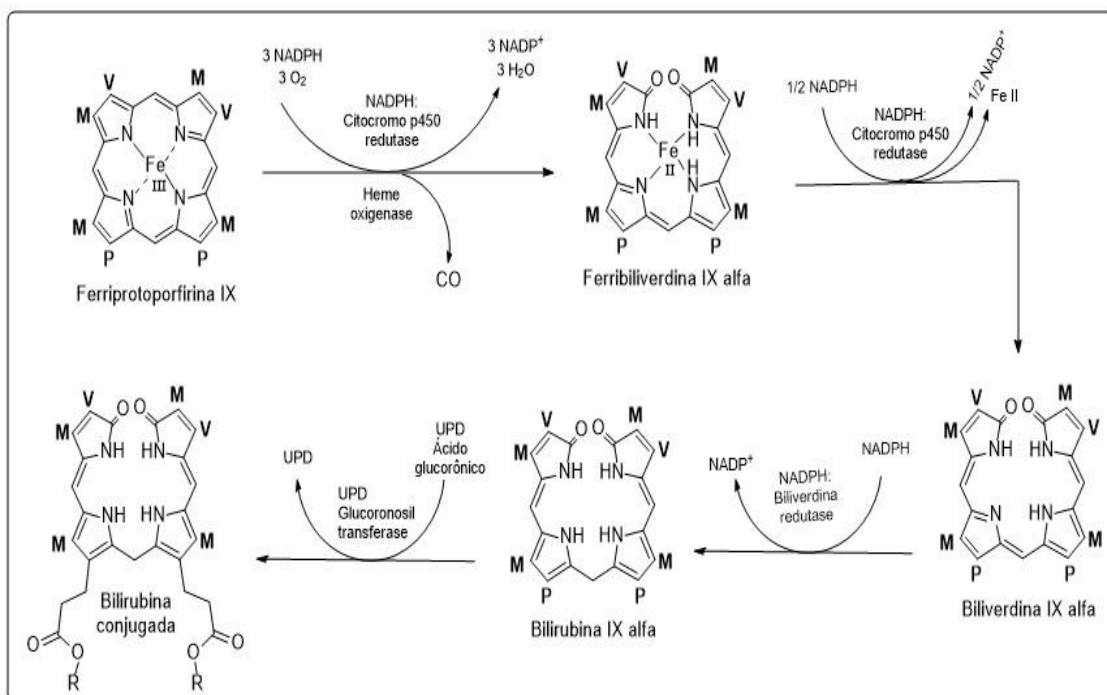
A heme oxigenase (HO) é uma classe de enzimas que degradam o grupamento heme das hemoproteínas. São classificadas em quatro isoformas: HO-1, HO-2, HO-3 e HO-4. As três enzimas são produtos de diferentes genes e seus padrões de expressão variam conforme os diferentes tecidos e tipos celulares. No entanto, apenas HO-1 é altamente induzível (Souza, 2007; Waza et al., 2018).

2.3.1.1 Hemeoxigenase-1

A enzima HO-1 converte o grupo heme em biliverdina (BV), monóxido de carbono (CO) e íons de ferro livre (Figura 3) (Waza et al., 2018). HO-1 é uma enzima encontrada no grupo de proteínas “heat shock” (do português, choque térmico), sendo assim, sua expressão ocorre como resultado de estímulos estressores químicos ou físicos, como hipóxia, metais pesados, radiação UV, espécies reativas (Bauer et al., 2003; Ryther, 2021). HO-1 pode ser ativada com baixa concentração de substrato e ter sua atividade aumentada pela alta concentração de grupamento heme.

No decorrer do processo de degradação do grupo heme, HO-1 quebra a ponte metenil entre anéis de pirróis, posteriormente ocorrem duas oxigenações e, a liberação de ferro II, CO e biliverdina através da redução de NADPH. A enzima biliverdina redutase usa NADPH para converter BV em bilirrubina (BR). A BR é uma molécula apolar e lipossolúvel, assim, precisa ser conjugado a albumina sérica, pela ação da uridina difosfato glicosiltransferase (UDP) para ser transportado para o fígado e ser eliminado. O ferro II é captado pela ferritina para ser utilizado em novos grupos heme (Ryter, 2021).

Figura 4: Conversão do grupo heme em biliverdina



Fonte: Adaptada de Waza et al., 2018.

A BR atua como um antioxidante do tipo “scavenger” de espécies reativas nos fluidos extracelulares. A propriedade antioxidante da bilirrubina pode ser citoprotetora mesmo em condições fisiológicas, e quando conjugada albumina sérica, há o aumento da potência antioxidante (Ostrow e Tiribelli, 2003; Weaver et al., 2018). O ferro sequestrado pela ferritina pode atuar como antioxidante celular. O monóxido de

carbono pode exercer efeitos na apoptose, proliferação celular, imunomodulação e anti-inflamatórios, através da inibição do fator nuclear κ B (NF- κ B) (Ryter e Choi, 2015; Kim et al., 2018).

Apesar da HO-1 não estar diretamente atuando na remoção das espécies reativas, é uma enzima muito importante no combate aos fatores estressantes (Brasil et al., 2021; Rochette et al., 2018), bem como protege contra a toxicidade induzida por β -amilóide via produção de CO (Hettiarachchi et al., 2014). HO-1 possui funções fundamentais na inflamação modulado pelos seus produtos degradados do heme, de modo a regular negativamente citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 β e regular positivamente citocinas anti-inflamatórias. HO-1 pode ser modulada positivamente por antioxidantes que atuam no sistema fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), sendo uma possível estratégia terapêutica (Ryter e Choi, 2015).

2.3.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Os antioxidantes não-enzimáticos são moléculas que atuam como estabilizadoras de espécies reativas. Este tipo de antioxidante pode ser dividido em duas partes: endógenos, compostos produzidos no organismo, como por exemplo a GSH e a Coenzima Q10; exógenos, moléculas obtidas a partir da alimentação, tendo como exemplo a vitaminas C, vitamina B e carotenoides.

A GSH é um tripeptídeo que possui a capacidade de redução determinada pelo tiol da cisteína e é o tiol mais abundante no meio intracelular. Esta molécula pode ser considerada uma das mais importantes contra lesões oxidativas, pois é capaz de proteger contra os danos oxidativos por causas endógenas e exógenas (Barbosa et

al., 2010). A sua forma reduzida é GSH e a oxidada, como descrito anteriormente é GSSG (Halliwell e Gutteridge, 2015). GSH participa como cofator de diversas reações, como por exemplo nos mecanismos de resistência celular ao sistema de fármacos, desativando espécies e formando aduto. Através da ação catalítica de GSH-Px, GSH atua como um desintoxicante de H₂O₂ e alguns peróxidos lipídicos (Huber et al., 2008).

A vitamina C (ácido L-ascórbico) é um diácido solúvel em água, em pH fisiológico é encontrado em maior quantidade na forma desprotonada, como ascorbato. É através dessa característica que a vitamina C se torna um importante antioxidante, com capacidade doadora, reagindo com os radicais livres e produzindo um novo radical, semideidroascorbato, pouco reativo e regenerador de vitamina E por meio de doação de hidrogênio. Ainda, o ácido L-ascórbico tem ação de “scavenger” em espécies reativas de oxigênio e radicais peroxila. (Halliwell, 2006; Barreiros et al., 2006).

Os carotenoides são pigmentos encontrados em plantas e alguns microorganismos. Dentre a classe dos carotenoides, os que mais contém atividade antioxidante são: α -caroteno, β -caroteno, licopeno e luteína (Lourenço et al., 2019). Esses carotenoides tem capacidade antioxidante devido o deslocamento de elétrons desemparelhado pela estrutura da ligação dupla. Na presença dos radicais peroxila, hidroxil e superóxido, β -caroteno os reduz, inativando a reatividade (Valko et al., 2006).

Outros compostos fenólicos advindos da dieta podem atuar como antioxidantes protegendo aos danos oxidativos e reduzindo riscos de doenças crônicas. Essas moléculas são bioativas e podem ser fundamentais no processo de eliminação dos radicais através da capacidade das ligações duplas nos fenóis deslocar elétrons

desemparelhados. Um exemplo é a classe dos flavonoides, com propriedades anti-inflamatória e antioxidantes bem definidas.

3. FISILOGIA MITOCONDRIAL

A mitocôndria é uma organela presente na maior parte das células eucariontes, especializada em transformar e conservar energia por meio de vias metabólicas como o ciclo de Krebs (ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos), da oxidação de biomoléculas (como ácidos graxos, aminoácidos e corpos cetônicos) e da fosforilação oxidativa. As mitocôndrias formam uma rede dinâmica e associativa que está interligada a outros compartimentos celulares, desempenhando um papel multifuncional (Pfanner et al., 2019). Sua estrutura e dinâmica complexa é o que define a função mitocondrial e a resposta aos estímulos.

A mitocôndria é formada por membranas mitocondriais externas (OMM) e internas (IMM), que fazem fronteira com o IMS e a matriz (Eisner et al., 2018). A OMM é permeável a moléculas pequenas ($M_r < 5000$) e a íons, que se movem livremente por canais transmembranas. A IMM é impermeável a maior parte das moléculas, e as que circulam precisam de transportadores específicos para se movimentar. Os componentes da cadeia transportadora de elétrons (ETC) e ATP-sintase estão alojados na IMM (Nelson e Cox, 2014; Nunnari e Suomalainen, 2012).

A ETC consiste em quatro complexos de proteínas (I-IV), que através das reações redox em sequência, sofre mudanças conformacionais para bombear prótons da matriz para o IMS. A fosforilação oxidativa se inicia com a entrada de elétrons na ETC, advindos da ação das desidrogenases. O NADH transfere os elétrons para complexo da NADH-desidrogenase, ou complexo I, que catalisa a transferência para

a ubiquinona, (coenzima Q), de um íon hidreto e um próton da matriz, levando a formação do ubiquinol. Em simultâneo, ocorre a retirada de quatro prótons por par de elétrons da matriz para IMS. O complexo II, succinato-desidrogenase, produz FADH₂ através da reação de oxidação do succinato a fumarato. O FADH₂ doa seus elétrons para a ubiquinona, permitindo a coenzima Q reduzida, transferir elétrons ao complexo III, assim possibilitando o transporte de prótons da matriz para IMS. O citocromo c-oxidoreductase, complexo III, transfere um elétron para o citocromo c e passa para o próximo complexo. O complexo IV, citocromo oxidase, na etapa final carrega os elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, formando água, por uma reação de redução (Eisner et al., 2018; Nelson e Cox, 2014).

A força próton-motriz é a conservação da energia da transferência dos elétrons na forma de um gradiente de prótons, e é caracterizada por dois componentes: (I) energia potencial química, pela diferença de concentração de H⁺ na região IMS; e (II) energia potencial elétrica, resultado da separação de cargas quando H⁺ se move através da membrana sem um contra-íon. À medida que os prótons fluem para matriz por meio da ATP-sintase, a energia eletroquímica advinda da força próton-motriz impulsiona a síntese de ATP, através de ADP + Pi. (Nelson e Cox, 2014).

A ETC possui dois carreadores móveis de elétrons, sendo esses: A coenzima Q, um lipídio redox que medeia a transferência de elétrons dos complexos I e II para o III e quando necessário, é um cofator para muitas outras enzimas; citocromo c, receptor de elétrons do complexo III para o complexo IV (Pfanner et al., 2019). O fluxo de elétrons da ETC para MMI, que transfere elétrons do NADH e FADH₂ para O₂ é uma das características da fosforilação oxidativa, sendo esta, o processo de fosforilação de ADP em ATP, utilizando a energia liberada nas reações de oxirredução.

No decorrer da respiração mitocondrial espécies reativas de oxigênio são formadas. Quando a quantidade dessas espécies é elevada, gera um estresse oxidativo e a mitocôndria entra em um processo de perda de função. Isto acarreta a disfunção mitocondrial, conduzindo a ausência de produção de ATP e ocasionando a morte celular (Trachootham et al., 2008).

4. CONSEQUENCIAS DA SUPERPRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

A alteração da homeostase redox pode causar danos ao organismo, desde pequenas alterações em biomoléculas à lesão celular. As principais moléculas que são capazes de serem modificadas pelo desequilíbrio redox são: proteínas, lipídios e DNA. Os efeitos deletérios são distintos e ocorrem conforme a interação da espécie reativa com cada biomolécula.

A oxidação de proteínas pode ser causada pelo radical hidroxil, através da reação de Fenton catalisada por íon de ferro, o metal mais abundante e capacitado para catalisar reações com biomoléculas (Halliwell e Gutteridge, 2015). Danos as proteínas por $\text{OH}\bullet$ alteram os aminoácidos estruturais da proteína, formando um radical centrado no carbono, produzindo carbonilas (aldeídos e cetonas) e que podem formar radicais peroxila (Lu et al., 2010). A cadeia lateral de todos os aminoácidos são vulneráveis a oxidação por radiação e pela ação das espécies reativas. A maior parte dos prejuízos causados pelos radicais livres são suscetíveis ao reparo, contanto as proteínas mitocondriais aconitase e nucleotídeo adenina translocase podem ser alvo de danos ao longo prazo (Valko et al., 2006).

A estrutura do DNA ao sofrer oxidação pode ocorrer quebra de fita simples ou dupla, modificações nas bases púricas e pirimídicas ou desoxirribose e ligações

cruzadas de DNA (Valko et al., 2006). Dentre as bases, a guanina é a mais suscetível ao dano oxidativo. A alteração no DNA por oxidação, juntamente com a hidrólise e metilação de DNA contribuem para a instabilidade do genoma, resultando em mutagênese e podendo ocorrer a carcinogênese (Sies et al., 2017; Valko et al., 2006).

A oxidação de lipídios como ácidos graxos poli-insaturados de fosfolipídios são os mais sensíveis entre as espécies reativas. Com isso, a membrana é o componente celular que mais sofre com a ação das ERO, causando uma peroxidação lipídica, alterando sua estrutura e permeabilidade. O mecanismo de oxidação dos lipídios é dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A etapa de iniciação é a qual ocorre o sequestro de hidrogênio por um radical hidroxila ou radical alcóxila ($LO\bullet$) e forma-se um radical lipídico ($L\bullet$). Na primeira parte da propagação $L\bullet$ reage com O_2 formando um radical peróxila ($LOO\bullet$), e na segunda o radical peróxila abstrai um hidrogênio e forma novamente $L\bullet$. Por fim, a etapa de terminação acontece através da combinação dos dois radicais formando um não radical, o hidroperóxido lipídico ($LOOH$). O $LOOH$ sofre reações de desconstrução produzindo o malondialdeído, o principal produto e marcador bioquímico da peroxidação lipídica (Valko et al., 2006; Halliwell e Gutteridge, 2015). Os efeitos deletérios que da lipoperoxidação são a diminuição de fluidez de membrana, aumento de vazamento da membrana para substâncias que utilizam canais, como por exemplo: K^+ , Ca^{2+} e o dano em proteínas de membranas (Halliwell, 2006).

4.1 Doenças relacionadas ao desequilíbrio redox e inflamação

O dano nos componentes celulares advindo da alteração da homeostase redox pode estar relacionado a diversas patologias, como as doenças cardiovasculares,

doença de Huntington, doença de Parkinson e doenças metabólicas. As espécies reativas tem capacidade de alterar as biomoléculas podendo ter também implicações no envelhecimento. Logo, compreender o metabolismo do estresse oxidativo é fundamental para entender e explorar as doenças que podem estar envolvidas nesse processo.

O estresse oxidativo pode provocar lesões no DNA e na membrana mitocondrial, desencadeando apoptose. Isso pois, o dano mitocondrial libera um extravasamento do citocromo c, por meio do aumento da permeabilidade da OMM (Engers et al., 2011). O citocromo c vai ao citosol, interagindo com monômeros de proteína Apaf-1 (protease fator 1 de ativação de apoptose), formando apoptossomo. Após cascatas de sinalização forma-se caspase-9, ativando a procaspase-3 estimulando a morte celular (Voet et al., 2014). Com a ativação da apoptose muita mutação no DNA pode ser controlada, mas também pode ser um instrumento de morte celular nos tecidos, correlacionada ao envelhecimento.

O cérebro dos mamíferos é considerado um conjunto de células sensíveis ao dano oxidativo, devido ao seu alto consumo de O_2 . O principal motivo para que esse gasto seja primordial é a necessidade de ATP para manter o equilíbrio dos íons intracelulares neuronais em todas as aberturas e fechamentos dos canais iônicos associados a propagação de potenciais de ação e neurosecreção. Além disto, o cérebro tem outros problemas como o grande consumo de O_2 desencadeando uma maior produção de $O_2^{\bullet-}$, a presença de ferro livre em todo o cérebro, auxiliando a formação de OH^{\bullet} pela reação de Fenton, e vários neurotransmissores serem autoxidáveis, facilitando a continuação de produção de ERO (Halliwell, 2006).

Ademais, os danos causados pelo desequilíbrio redox alteram na substancia negra os níveis de GSH, os diminuindo e paradoxalmente aumentando HNE (4-

hidroxi-2-trans-nonenal), peroxidação lipídica, isofuranos, produtos de dano oxidativo do RNA (8-hidroxi-2-deoxiguanosina e 8-hidroxi-guanosina) e carbonilação em proteínas (Halliwell, 2006).

A doença de Huntington também está relacionada ao desequilíbrio redox, desempenhando funções do desenvolvimento e progressão desta patologia. Em decorrência da peroxidação lipídica, a membrana mitocondrial envasa mais substâncias que o normal. A proteína da doença de Huntington mutante altera a atividade mitocondrial, liberando citocromo c pela abertura da membrana e ativando a apoptose. Essa correlação altera o tampão cálcio na mitocôndria e aumenta o distúrbio mitocondrial, logo, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio. (Kausar et al., 2018).

A inflamação é um processo biológico de defesa contra patógenos, envolvendo cascatas de sinalizações devido a estímulos químicos, físicos ou biológicos maiores que a adaptação da célula. A inflamação está associada a muitas doenças patogênicas, como infecções, doenças autoimunes, diabetes mellitus, e relacionada a inúmeros outros fatores, como radiação, produtos químicos tóxicos, consumo de álcool e tabagismo (Hussain et al., 2016). Ainda, a inflamação pode ser aguda ou crônica, dependendo do processo inflamatório e dos mecanismos celulares. Uma inflamação aguda é a primeira linha de defesa do organismo e de menor duração, enquanto a inflamação crônica é de longa duração (Boarescu et al., 2022).

A inflamação possui fases que se diferenciam pela liberação de substâncias químicas, atuando como uma resposta mediadora, diversificada pela intensidade e o tipo de agressão, denominados de pró-inflamatórios. Esses são caracterizados por aminas vasoativas, mediadores lipídicos, quimiocinas, citocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (Cruvinel et al., 2010). No decorrer da resposta

inflamatória diferentes células estão envolvidas, como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células endoteliais entre outras (Lima et al., 2007).

Ainda, o estresse oxidativo é um fator associado a inflamação por ativar diversos mediadores inflamatórios envolvidos em doenças crônicas. A liberação de radicais livres por neutrófilos durante a inflamação contribui para dano em tecidos vizinhos (Smith et al., 2007). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1B) são citocinas pró-inflamatórias que foram induzidas durante o estresse oxidativo pela diabetes e outras doenças metabólicas, para regular positivamente as reações inflamatórias (Hussain et al., 2016).

Nas doenças metabólicas, como diabetes mellitus, há o aumento de moléculas endógenas com potencial efeito deletério, que corroboram para o aumento de citocinas pró-inflamatórias podendo acarretar o aumento de produção de espécies reativas. Ainda, essas moléculas induzem ao dano oxidativo e são citotóxicas. Assim, podem produzir cascatas de sinalizações que são capazes de gerar diversos outros prejuízos metabólicos.

5. METILGLIOXAL

O metilglioxal (MG) também conhecido como acetilformadeido, piruvaldeido ou 2-oxopropanal segundo IUPAC (PubChem, 2004). É um composto dicarbonílico que tem origem endógena principalmente na via da glicólise, pela degradação não enzimática de gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxicetona fosfato. Contudo, MG pode também ser formado fisiologicamente por peroxidação lipídica, autoxidação de moléculas de glicose, degradação de proteínas glicadas, catabolismo de acetona e treonina. Embora, MG seja metabolizado fisiologicamente, a sua taxa de formação

depende do metabolismo celular, tecidos e organismos (Allaman et al., 2015; Prestes, 2017). Além disso, MG é formado de modo exógeno a partir da produção produtos alimentares, fumaça de cigarro, atmosfera urbana, processos de fermentação de microrganismos e em algumas plantas (Hansen, 2011).

Os altos níveis de MG acontecem quando há excesso de seus precursores, como no estado de hiperglicemia, deficiência de triosefosfato isomerase e uso prejudicado da glicose, comprovados em pacientes com diabetes mellitus (Allaman et al., 2015; Brenner et al., 2014). Em condições de alta concentração MG, diversas proteínas podem ser modificadas por glicação. A glicação é uma reação não enzimática entre aldeídos de compostos carbonílicos com grupamento amino de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Apesar de MG ser considerado um agente glicante com característica toxicante, parte dos seus danos advém da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGES), que pode ser gerado no meio extra e intracelular (Prestes, 2017).

A formação e a eliminação de MG estão relacionadas a formação de espécies reativas. A partir de aminoacetona produz-se MG verifica-se a formação de H_2O_2 e amônio (NH_4^+), catalisada por aminoxidase sensível a semicarbazida (SSAO). Do mesmo modo, MG é produzido por aminoacetona não-enzimaticamente originando também NH_4^+ e O_2^{\bullet} . No decorrer da degradação de MG por autoxidação e pela enzima glioxal oxidase, H_2O_2 é produzido (Kalapos, 2008a). Assim, MG é capaz de induzir disfunção mitocondrial, comprometendo a homeostase da biologia redox e morte celular em mamíferos (Souza et al., 2021).

Em busca de evitar os efeitos tóxicos de MG diferentes mecanismos fisiológicos podem ser acionados, como a via da glioxalase dependente de glutathiona, aldose redutase, aldeído desidrogenase e carbonil redutase (Allaman et al., 2015). Além

disso, outras formas de proteger o organismo por MG são a partir de moléculas bioativas de origem vegetal ou marinha, capazes de suprimir os efeitos danosos oxidativos de MG por meio de vias de sinalização (de Oliveira et al., 2020).

6. MOLÉCULAS BIOATIVAS POTENCIALMENTE CITOPROTETORAS

As moléculas bioativas são potencialmente conhecidas como estratégia para prevenção e retardo de muitas doenças. Essas substâncias são identificadas em inúmeros estudos como agente citoprotetoras e com muitas bioatividades importantes, incluindo os processos mitocondriais. Grande parte dessas moléculas são polifenóis naturais, um dos grupos mais extensos, caracterizados pela presença de ao menos um grupamento hidroxila ($^{\circ}\text{OH}$) ligada a um anel aromático. Diante das bioatividades dos polifenóis, a atividade antioxidante vem sendo amplamente estudada, pois eles agem na mitocôndria como eliminador de espécies reativas, de modo direto ou indireto, atuam nos mecanismos de modulação mitocondrial, previnem apoptose e atuam na ETC e produção de ATP (Li et al., 2014; Naoi et al., 2019).

Dentre os polifenóis, os flavonoides são os mais comuns, com uma estrutura característica de dois anéis benzênicos ligados a um anel de pirona, com ao menos uma hidroxila cada grupo. As isoflavonas são um dos 6 subgrupos dos flavonoides, encontrados na soja e seus derivados, e alguns legumes. São conhecidas por terem atividade antioxidantes, consideradas como quimioprotetoras usadas como terapia alternativa para diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e osteoporose (Křížová et al., 2019).

6.1 Astaxantina

A astaxantina (AST) é um polieno, da família das xantofilas, encontrada em derivados oxigenados dos carotenoides. É um pigmento presente em microalgas, crustáceos, salmonídeos e outros alimentos para a criação de peixes, com o intuito de fornecer a cor laranja e avermelhada (Higuera-Ciapara et al., 2006). Sua descrição de acordo com a IUPAC é: 3,3'-dihidroxi- β - β -caroteno-4,4'-diona, fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$, massa molecular 596,84 g/mol, descrição física sólida e insolúvel em água (PubChem, 2021). AST pode ter três isômeros (figura 4), 2 enantiômeros (3R, 3'R; 3S, 3'S) e 1 mesocomposto (3R, 3'S), sendo o enantiômero 3S, 3'S o composto mais abundante (Higuera-Ciapara et al., 2006; Parajo et al., 1996).

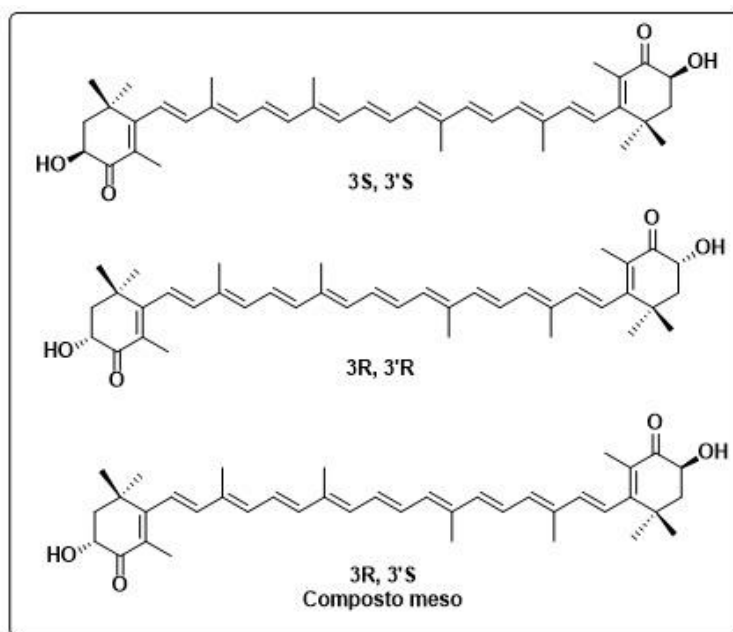
A AST em sua forma livre é instável e sensível, assim, pode formar monoésteres ou diésteres através da esterificação com ácidos graxos, ou também pode se associar a proteínas como na musculatura do salmão, exoesqueleto de lagosta ou na carapaça dos crustáceos, na qual sua coloração é alterada para verde, azul ou cinza (Ghiggi, 2007). Assim, as formações de ésteres ou associação a resíduos de aminoácidos estabilizam essa molécula.

A literatura apresenta diversas fontes de AST (tabela 1), mas AST pode ser produzida principalmente por microalga *Haematococcus pluvialis*, pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, pelo fermento *Phaffia rhodozyma* (Higuera-Ciapara et al., 2006). A biossíntese de AST varia conforme os microrganismos produtores, contanto a reação é através de via do ácido mevalônico, pelo acetato proveniente da fotossíntese e/ou respiração, após cascatas distintas de produção forma-se β -caroteno, que oxida para formar astaxantina (Ghiggi, 2007).

AST também pode ser encontrada na forma sintética, por uma mistura racêmica entre todos os isômeros (1: 2: 1). AST sintética é o principal carotenoide utilizando na

aquacultura, como fonte de pigmentação para os crustáceos e peixes (Higuera-Ciapara et al., 2006). Isso pois, alguns animais são incapazes de sintetizar AST, logo, para a cor desejada é necessário a suplementação. A AST sintética pode diminuir em 50% sua atividade no sistema biológico (Galasso et al., 2018). Pode ocorrer em forma de cadeia, as microalgas biossintetizam AST, consumidas por zooplâncton, insetos ou crustáceos, depois ingeridos por peixes (Ghiggi, 2007; Higuera-Ciapara et al., 2006).

Figura 5: Molécula de Astaxantina e seus isômeros



Fonte: Próprio autor.

A molécula de AST vem sendo investigada como uma possível terapia para diversos tipos de patologias. Isso ocorre pelo modo que a molécula de AST se liga a membrana celular, de dentro para fora. Como atividade antioxidante, AST apresentou um papel de melhor atividade biológica do que outros, devido a sua propriedade de ter ligações duplas conjugadas, doando elétrons e convertendo radicais livres em produtos estáveis. Ademais, a cadeia de polieno da AST retém os radicais na

membrana celular, enquanto o anel terminal de AST pode eliminar os radicais na parte externa e interna da membrana (Ambati et al., 2014).

Tabela 1: Fontes de AST

Fonte	Astaxantina (%) com base no peso seco
Clorofíceas	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3,8
<i>Haematococcus pluvialis</i> (K-0084)	3,8
<i>Haematococcus pluvialis</i> (isolamento local)	3,6
<i>Haematococcus pluvialis</i> (AQSE002)	3,4
<i>Haematococcus pluvialis</i> (K-0084)	2,7
<i>Clorococcum</i>	0,2
<i>Chlorella zofingiensis</i>	0,001
<i>Neochloris wimmeri</i>	0,6
Ulvophyceae	
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0,02
<i>Ulva lactuca</i>	0,01
Florideophyceae	
<i>Catenella repens</i>	0,02
Alphaproteobacteria	
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	0,01
<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (NITE SD 00017)	2,2
Tremelomicetos	
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (JH)	0,5
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (VKPM Y2476)	0,5
Labirintulomicetos	
<i>Thraustochytrium</i> sp. CHN-3 (FERM P-18556)	0,2
Malacostraca	
<i>Pandalus borealis</i>	0,12
<i>Pandalus clarkia</i>	0,015

Fonte: Ambati et al., (2014).

Ainda, AST pode ser mais bioativa devido à presença de um grupo ceto e hidroxila de cada extremidade de sua molécula. Além de estabilizar os radicais livres, AST tem a capacidade de modular a expressão das enzimas responsivas ao estresse oxidativo, como a HO-1. AST mostrou ter efeito protetor como dano ao DNA induzido pela ciclofosfamida, ativando Nrf2 e modulando HO-1 (Davinelli et al., 2018). AST pode agir inibindo a peroxidação lipídica e regulando a expressão gênica, assim como diminuir os ERO induzidos pela isquemia, aumentando os níveis de SOD (Galasso et al., 2018). Assim, autores supõe que AST não atua somente na eliminação de radicais livres, mas também ativando a defesa antioxidante celular (Galasso et al., 2018; Niu et al., 2018).

Como ação imunomoduladora, AST vem sendo usada como um medicamento para o tratamento de doenças autoimunes, como esclerose múltipla e artrite reumatoide (Higuer-Ciapara et al., 2006). A modulação ocorre por AST aumentar a produção de imunoglobulinas A, M e G, e o linfócitos T-auxiliares (Ghiggi, 2007).

Como função anti-inflamatória, AST possui capacidade de interromper a inflamação nos sistemas biológicos. AST exerce a função de proteger as células hepáticas e neuronais. Essa molécula tem a capacidade de suprimir os mediadores inflamatórios IL-1 β e TNF- α , E bloquear a produção de óxido nítrico. É também capaz de atenuar a ativação da micróglia e a consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (Galasso et al., 2018).

AST pode promover a integridade funcional das mitocôndrias (Davinelli et al., 2018), bem como promover a proteção mitocondrial em células cerebrais por estudos *in vivo*, evitando a disfunção mitocondrial pelo mecanismo Nrf2/HO-1 em células tratadas com glutamato mediando a toxicidade (Brasil et al., 2021). AST demonstrou inibir a liberação do citocromo c resultante da permeabilização da membrana,

prevenindo a apoptose de células mediadas pela mitocôndria (Kim e Kim, 2018). Em células SH-SY5Y tratadas em privação de oxigênio e glicose, AST também demonstrou ter resposta anti-apoptótica (Zhang et al., 2020).

No cérebro, a AST demonstrou promover a neurogênese e aumentar a plasticidade neural, processos que diminuem conforme a idade. AST apresentou efeitos benéficos reduzindo a neurotoxicidade em camundongos com doença de Parkinson. AST pode recuperar os neurônios motores lesados pela inibição de Cu/Zn-SOD (Galasso et al., 2018). Outro efeito de AST *in vitro* foi proteger contra a lesão de isquemia cerebral por indução de angiogênese via sinalização de Wnt/ β -catenina, bem como a neuroproteção contra a neurotoxicidade induzida por H₂O₂ (Zhang et al., 2020).

Ademais, pesquisas *in vivo* e *ex vivo* indicam que AST pode ter efeitos: anticâncer, inibidor de oxidação de LDL prevenindo aterosclerose, auxiliador no tratamento do sistema gastrointestinal, atividade de prevenção de anticatarata, potente efeito anti-rugas e auxiliar na sobrevivência celular (Higuera-Ciapara et al., 2006; Yan et al., 2016). No que tange ao aspecto toxicológico, AST demonstrou ser segura e não tóxica quando consumida com alimentos, possibilitando ser um composto seguro e biodisponível (Higuera-Ciapara et al., 2006; Davinelli et al., 2018).

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo geral

Investigar o potencial efeito citoprotetor da astaxantina em modelo experimental de desordem metabólica induzida por MG.

7.2 Objetivos específicos

Analisar o efeito preventivo de AST em diferentes concentrações, em relação a viabilidade das células SH-SY5Y expostas ao MG;

Observar se AST previne disfunção redox e bioenergética causada pelo MG a nível celular e de membrana mitocondrial;

Analisar se o pré-tratamento com AST induz a atividade de HO-1 nessa mesma linhagem celular;

Investigar se AST previne as consequências da superprodução de espécies reativas induzidas por MG;

Observar a capacidade de AST exercer efeito anti-inflamatório nas células expostas ao MG através da produção de citocinas pró-inflamatórias;

Confirmar a relação da via BVR/HO-1 na citoproteção induzida por AST neste modelo experimental;

Comparar AST com outros agentes citoprotetores quanto a viabilidade e o estado energético das células SH-SY5Y.

PARTE II:
Metodologia e Resultados.

1. Metodologia

1.1 Materiais

Utilizou-se material plástico adquirido da Corning Inc. (NY, EUA) e da Beckton Dickson (NJ, EUA) para o cultivo celular. Reagentes químicos de uso rotineiro e outros utilizados na manutenção do cultivo celular foram obtidos da Sigma-Aldrich (MO, EUA). Outros reagentes específicos e kits de ensaios bioquímicos foram obtidos de fabricantes diversos, conforme citado abaixo em detalhes.

1.2 Cultivo celular

A linhagem SH-SY5Y representa um tipo celular que produz e que responde ao neurotransmissor dopamina e foi utilizada no estado não-diferenciado. As células foram adquiridas do American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA) e o cultivo se deu em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês Dulbecco's modified Eagle's medium) em associação com meio HAM F-12 (mistura de 1:1), sendo suplementado com soro fetal bovino 10%, glutamina a 2 mM, penicilina a 1000 U/mL, estreptomicina a 1000 µg/mL, e anfotericina B a 2,5 µg/mL em atmosfera de CO₂ a 5% umidificada e temperatura de 37°C.

1.3 Tratamentos químicos

MG a 500 µM foi utilizado como indutor de estresse mitocondrial e celular neste modelo experimental. Nesta concentração, o MG induz declínio de 50% na viabilidade da linhagem SH-SY5Y após 24 horas de exposição, conforme demonstrado por nosso grupo de pesquisas (de Oliveira et al., 2015) e por outros (Angeloni et al., 2015). A AST foi administrada às células, inicialmente, em diferentes concentrações (5 – 40

μM) por 24 horas antes da exposição ao toxicante MG por 24 horas adicionais. Após confirmada a concentração de AST mais eficiente em prevenir a queda de viabilidade celular induzida pelo MG, utilizou-se a xantofila na concentração de 20 μM nos demais ensaios. ZnPP-IX (protoporfirina de zinco-IX) a 10 μM foi usado como inibidor de HO-1 em alguns testes, sendo administrado 1 hora antes do tratamento com AST. Dimetil sulfóxido (DMSO) foi usado para solubilizar AST em concentração final menor que 0,1% e não afetou nem a viabilidade das células nem parâmetros relacionados à atividade mitocondrial (dados não mostrados).

1.4 Viabilidade celular e citotoxicidade

A viabilidade celular foi testada de acordo com o método descrito por Mosmann (1983). Brevemente, as células (5 x 10⁵ células/mL) foram expostas ao brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) por 1 hora após cada tratamento e mantidas a 37°C. Após este passo, removeu-se o meio de cultivo e as células foram lavadas com tampão fosfato (pH 7,4). O reagente MTT origina um composto do tipo formazan após reação mediada por desidrogenases, sendo necessário solubilizá-lo com DMSO em incubação de 30 min de duração. A leitura em espectrofotômetro a 570 nm ocorre após aquela etapa. A atividade de lactato desidrogenase (LDH) em meio extracelular foi usada como índice de citotoxicidade e se deu por meio do uso de kit comercial seguindo os passos recomendados pelo fabricante (Abcam, MA, EUA; código ab102526). A LDH localiza-se no citoplasma e é liberada para o meio de cultivo quando a integridade da membrana plasmática é diminuída após exposição a estressores de diversas naturezas.

1.5 Isolamento mitocondrial

Após expor as células aos tratamentos mencionados para cada grupo experimental, as mesmas foram lavadas e coletadas em tampão contendo sacarose a 250 mM, KCl a 10 mM, EGTA a 1 mM, EDTA a 1 mM, MgCl₂ a 1 mM, ditioneitol a 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil a 1 mM, benzamindina a 1 mM, pepstatina A a 1 mM, leupeptina a 10 mg/mL, aprotonina a 2 mg/mL e HEPES a 20 mM (pH 7,4). Imediatamente após essa etapa, homogeneizou-se e centrifugou-se as células a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido deste procedimento foi centrifugado a 11000 x g por 10 minutos a 4°C rendendo mitocôndrias íntegras e viáveis, conforme publicado previamente por Wang et al. (2014). Após a extração das mitocôndrias íntegras, foram obtidas as partículas submitocôndrias (PSM), que são membranas mitocondriais invertidas contendo o sistema da fosforilação oxidativa, por meio de congelamento e descongelamento (3 vezes), conforme descrito por Poderoso et al. (1996). As PSM não contêm enzimas de matriz mitocondrial, incluindo a Mn-SOD, que poderiam influenciar nos dados de interesse a nível de membranas mitocondriais. Nas PSM, foram analisados os níveis de marcadores de peroxidação lipídica, de carbonilação de proteínas e estado redox de grupos sulfidril de proteínas, conforme descritos a seguir.

1.6 Quantificação dos níveis de ATP

Os níveis de ATP foram quantificados por meio da análise da fosforilação de glicerol, segundo protocolo disponibilizado por fabricante de kit comercial (Abcam, EUA; código ab83355). Brevemente, cerca de 1 x 10⁶ células foram coletadas e lavadas em tampão fosfato gelado. Utilizou-se o tampão de ensaio de ATP (fornecido

no kit) para ressuspender as células, que foram homogeneizadas por meio de pipetagem. Centrifugou-se as células a 13000 x g por 5 minutos a 4°C para remoção de materiais insolúveis. O sobrenadante resultante foi transferido para outro tubo e mantido no gelo. As amostras foram desproteinizadas com uso de ácido tricloroacético (fornecido pelo fabricante; código ab204708). Após pipetar os reagentes do kit e as amostras nas placas de 96 poços, a leitura se deu em fluorímetro de placa com excitação a 535 nm e emissão a 587 nm.

1.7 Detecção da produção de espécies reativas

O nível de espécies reativas foi quantificado por meio do uso de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Esta molécula se difunde para o interior das células, sendo clivada por esterases e originando o composto fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína, que reage com espécies reativas. As células foram expostas a 100 µM de DCFH-DA nos últimos 30 minutos dos tratamentos com AST, MG e/ou ZnPP-IX. Após este período, o meio de cultura foi trocado e a oxidação de DCFH foi acompanhada durante 30 minutos a 37°C em fluorímetro de placa (ex: 485 nm; em: 535 nm).

1.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O PMM foi analisado por meio do uso de kit comercial seguindo instruções do fabricante (Abcam, MA, EUA; código ab113850). O marcador catiônico iodeto de tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) se acumula em mitocôndrias funcionais conforme as alterações no gradiente eletroquímico das organelas. Declínio no gradiente promove formação de monômeros de JC-1, os quais emitem fluorescência detectada a 530 nm. Por outro lado, aumento do gradiente eletroquímico causa

agregação do JC-1, promovendo emissão de fluorescência alaranjada detectada a 590 nm. Desta forma, declínio nos valores obtidos da leitura de JC-1 agregado indica despolarização (isto é, perda do PMM) das organelas. As leituras foram registradas por fluorímetro de placa (Ex = 475 nm; Em = 530 e 590 nm).

1.9 Detecção dos níveis de malondialdeído (MDA), de proteínas carboniladas e análise do estado redox de grupos sulfidril proteicos

O MDA é um intermediário de peroxidação lipídica e, portanto, serve como marcador deste processo em diferentes tipos de amostras. Neste trabalho, os níveis de MDA foram detectados tanto em amostras totais (isto é, das células como um todo) quanto mitocondriais (nas membranas das organelas) usando protocolo recomendado por fabricante de kit comercial (Abcam, MA, EUA; código ab118970). Inicialmente, as amostras foram desproteinizadas e o MDA foi detectado em espectrofotômetro a 532 nm após reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O nível de proteínas carboniladas foi analisado em membranas mitocondriais usando kit comercial de ELISA e seguindo as instruções do fabricante (Abcam, MA, EUA; código ab23836). Após seguir o protocolo, as amostras foram lidas a 450 nm usando espectrofotômetro de placa. Os níveis de grupos tiois proteicos reduzidos foram analisados com uso de kit comercial aplicando o reagente Thiol Blue, conforme instruções do fabricante (Abcam, MA, EUA; código ab219272). As amostras foram lidas em espectrofotômetro de placa a 680 nm e a 280 nm. A razão entre estas leituras foi usada para calcular a quantidade de tiois proteicos nas amostras.

1.10 Nível de citocinas pró-inflamatórias

Foram utilizados kits comerciais para quantificar os níveis de IL-1 β e TNF- α de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante (Abcam, MA, EUA; códigos ab214025 e ab46087). Após os passos recomendados para estes ensaios, as amostras foram registradas em espectrofotômetro de placa a 450 nm.

1.11 Atividade da HO-1

A atividade de HO-1 foi avaliada de acordo com o protocolo publicado por Hwang et al. (2008). Brevemente, as amostras foram incubadas com hemina a 200 μ M, MgCl₂ a 200 μ M, BVR purificada em concentração suficiente para gerar 1,5 nmol de BR/min/mg de proteína, glicose-6-fosfato a 2 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase a 1 U/mL, NADPH a 1 mM, e tampão fosfato a 50 mM (pH 7,4) por 2 horas a 37 °C. Após este período de incubação, a reação foi parada com adição de clorofórmio. O sinal foi lido em 464 nm e 530 nm em um espectrofotômetro. Utilizou-se a diferença entre as leituras naqueles comprimentos de onda para se obter a quantidade de BR produzida em cada ponto de amostra.

1.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do uso do programa GraphPad 8.0. Os dados são mostrados como a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata ou mais. Os valores de p considerados significantes são aqueles menores que 0,05. Foram aplicados ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey a fim de analisar as diferenças entre cada grupo experimental.

2. RESULTADOS

Inicialmente, foi testado o efeito do tratamento prévio (24 h) com AST em diferentes concentrações (5 - 40 μM) em relação à viabilidade das células SH-SY5Y expostas ao MG (500 μM). De acordo com a Fig. 6, observa-se que o tratamento com MG induz queda significativa na viabilidade celular ($p = 0,0125$). Ainda, AST não afeta a viabilidade das células em exposição por 24 h. O pré-tratamento com AST a 5 ou 10 μM não é capaz de diminuir o efeito de MG sobre a viabilidade das células SH-SY5Y. Por outro lado, AST a 20 ou 40 μM previne a queda na viabilidade das células expostas ao MG ($p = 0,0221$ e $p = 0,0211$, respectivamente). A partir destes dados, decidimos utilizar AST a 20 μM nos demais experimentos. O efeito preventivo de AST a 20 μM foi confirmado, conforme mostra a Fig. 7, nas células expostas ao MG ($p = 0,0084$).

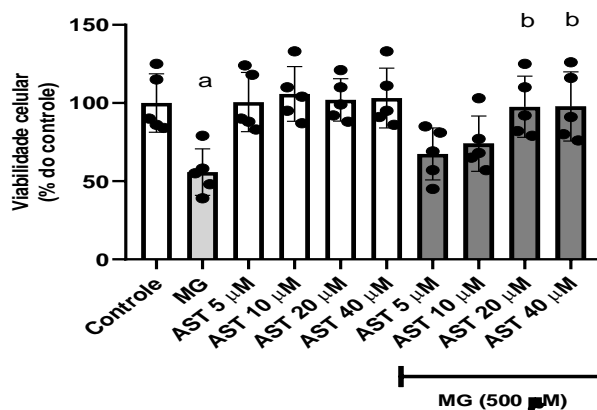


Figura 6: Efeitos da astaxantina (AST) e ou metilglioxal (MG) na viabilidade celular. A linhagem celular SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST em diferentes concentrações 24h antes da exposição a MG por mais 24h. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata, ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p=0,0125$ comparado ao grupo controle e (b) $p<0,05$ comparado a células tratadas com MG.

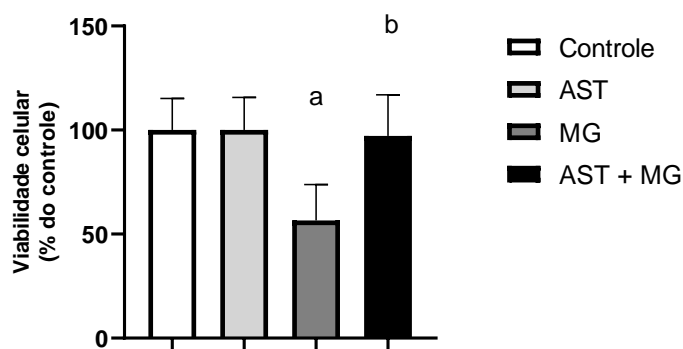


Figura 7: Confirmação do efeito protetor de AST de 20 μM quando exposta ao MG. As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST com 20 μM por 24h e posteriormente tratadas com MG 500 μM por mais 24h. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e (b) $p = 0,0084$ comparado a células tratadas com MG.

O pré-tratamento com AST também foi capaz de amenizar a perda de integridade de membrana observada nas células tratadas com MG (Fig. 8; $p < 0,0001$). Neste ensaio, a liberação da enzima LDH, que é majoritariamente encontrada no citoplasma, para o meio de cultivo indica ruptura da membrana plasmática e é indicativo da citotoxicidade resultante da exposição a determinados toxicantes.

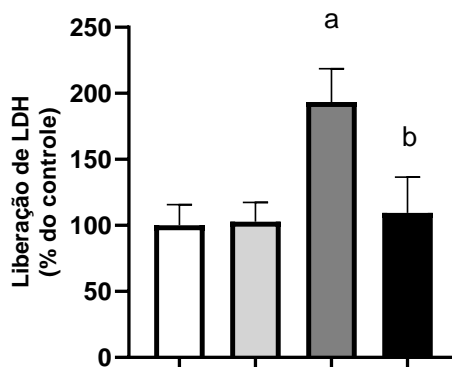


Figura 8: Ensaio de integridade de membrana. As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST com 20 μM por 24h e posteriormente tratadas com MG 500 μM por mais 24h e foram verificados os níveis da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e (b) $p < 0,0001$ comparados a células tratadas com MG.

Após obter estas informações gerais sobre a viabilidade celular, foi investigado se o tratamento prévio com AST exerceria algum efeito sobre os estados redox e energético das células SH-SY5Y expostas ao MG. De acordo com a Fig. 9A, AST

previne a peroxidação lipídica induzida por MG nas células testadas ($p < 0,0001$). Ainda, o pré-tratamento com esta xantofila diminui os níveis de ATP causado por MG neste modelo experimental (Fig. 9B; $p=0,0048$). Conforme trabalhos anteriores publicados pelo grupo de pesquisas, analisamos se a enzima HO-1 poderia ser modulada pela AST nas células SH-SY5Y (Brasil et al., 2021). Encontramos que AST a 10 e 20 μM , mas não a 5 μM , induz um aumento na atividade da enzima HO-1 (Fig. 10; $p = 0,0005$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Pré-tratamento com ZnPP-IX impede que a atividade de HO-1 seja aumentada pela AST a 20 μM , mostrando sua eficiência como inibidor específico desta enzima ($p < 0,0001$).

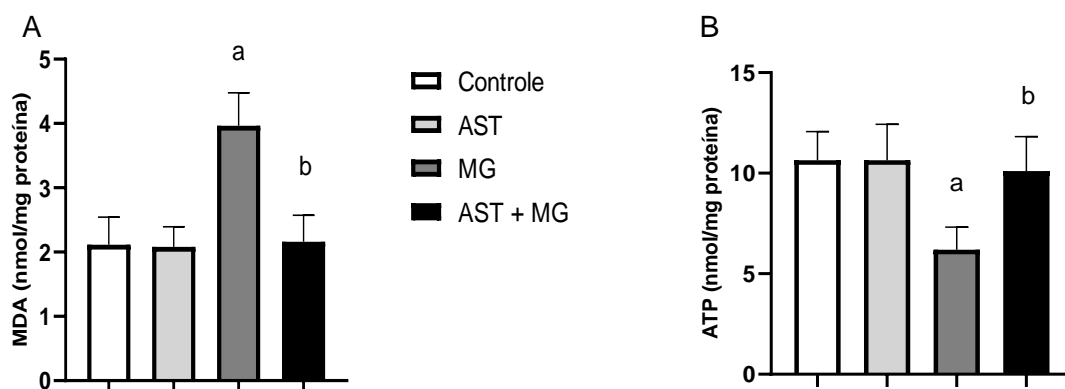


Figura 9: Ensaio de peroxidação lipídica (A) e de níveis de ATP (B). As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST com 20 μM por 24h e posteriormente tratadas com MG 500 μM por mais 24h e foram verificados os níveis de malondialdeído e os níveis de ATP. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e (b) $p < 0,001$ comparados a células tratadas com MG, para ambos os testes.

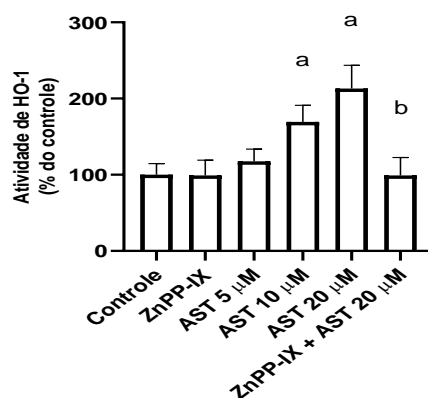


Figura 10: Ensaio da atividade de HO-1 em presença de AST. As células SH-SY5Y foram tratadas com AST em concentrações de 5-40 μ M por 24h. As células foram pré-tratadas com ZnPP-IX 10 μ M por 1h pelo mesmo período antes do tratamento com AST 20 μ M. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e (b) $p < 0,0001$ comparados a células tratadas com ZnPP-IX.

Como a HO-1 exerce papel citoprotetor em diferentes modelos experimentais, analisamos se esta enzima estaria envolvida também na citoproteção causada pela AST em células expostas ao MG (Mo et al., 2012; Brasil et al., 2021) Conforme demonstrado na Fig. 10, a inibição de HO-1 por ZnPP-IX desfaz a prevenção causada por AST quanto ao aumento na produção de espécies reativas estimulado por MG ($p = 0,0002$). Tratamento prévio com AST diminui o efeito de MG sobre a peroxidação lipídica mitocondrial (Fig. 11A; $p < 0,0001$). Além disso, AST previne o aumento nos níveis de carbonilação de proteínas nas mitocôndrias das células expostas ao MG (Fig. 11B; $p < 0,0001$). A inibição de HO-1 por ZnPP-IX impede que a AST exerça este papel antioxidante sobre as mitocôndrias das células tratadas com MG em relação à peroxidação lipídica e à carbonilação de proteínas ($p < 0,0001$ e $p = 0,0019$, respectivamente).

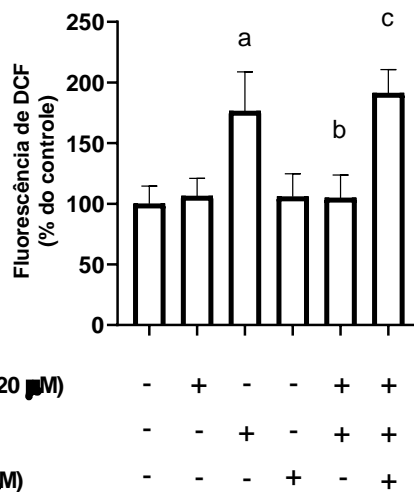


Figura 11: Ensaio de fluorescência de DCF. As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST com 20 μM por 24h e tratadas com MG 500 μM por mais 24h. As células foram pré-tratadas com ZnPP-IX 10 μM por 1h pelo mesmo período antes do tratamento com AST 20 μM. Os dados mostrados são a média ± o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, (b) $p < 0,001$ comparados a células tratadas com MG e (c) $p < 0,0001$ comparada ao controle.

AST também previne a oxidação de grupos tiol (ou “sulfidril”) causada pelo MG em proteínas mitocondriais das células expostas ao MG (Fig. 12; $p = 0,0021$). Inibição de HO-1 com ZnPP-IX suprime o efeito de AST também sobre este parâmetro ($p = 0,004$). O pré-tratamento com AST também alivia o efeito gerado por MG sobre parâmetros energéticos, conforme mostra a Fig. 13. AST previne a queda no PMM causada pelo MG (Fig. 13A; $p = 0,0001$). Ainda, tratamento prévio com AST atenua a queda nos níveis de ATP promovida por MG nas células SH-SY5Y (Fig. 13B; $p = 0,0001$). Inibição de HO-1 bloqueia o efeito induzido pelo tratamento prévio com AST sobre as mitocôndrias das células expostas ao MG ($p = 0,0001$ para ambos os parâmetros testados).

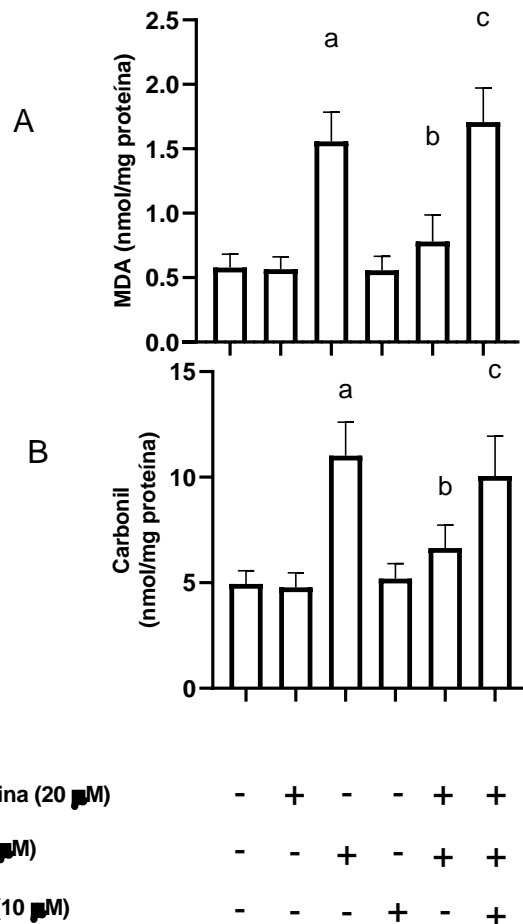


Figura 12:Ensaio de Peroxidação lipídica (A) e carbonilação de proteínas (B). As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST com 20 μ M por 24h e tratadas com MG 500 μ M por mais 24h. As células foram pré-tratadas com ZnPP-IX 10 μ M por 1h pelo mesmo período antes do tratamento com AST 20 μ M. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, (b) $p < 0,001$ comparados a células tratadas com MG e (c) $p < 0,0001$ comparada ao controle.

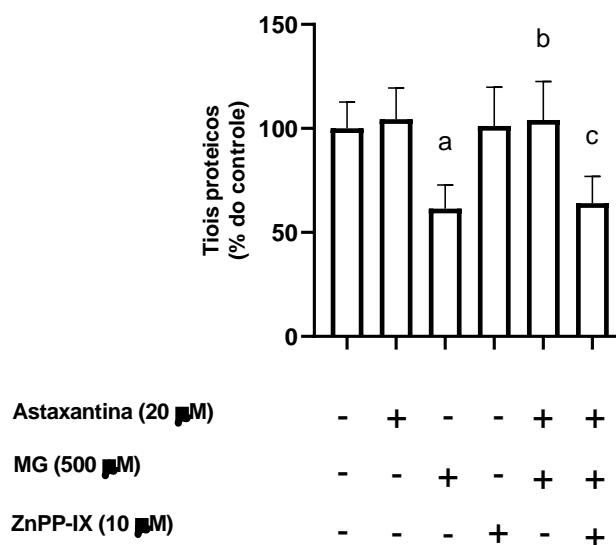


Figura 13: Oxidação do grupo tiol. As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST com 20 μ M por 24h e tratadas com MG 500 μ M por mais 24h. As células foram pré-tratadas com ZnPP-IX 10 μ M por

1h pelo mesmo período antes do tratamento com AST 20 μ M. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, (b) $p < 0,001$ comparados a células tratadas com MG e (c) $p < 0,0001$ comparada ao controle.

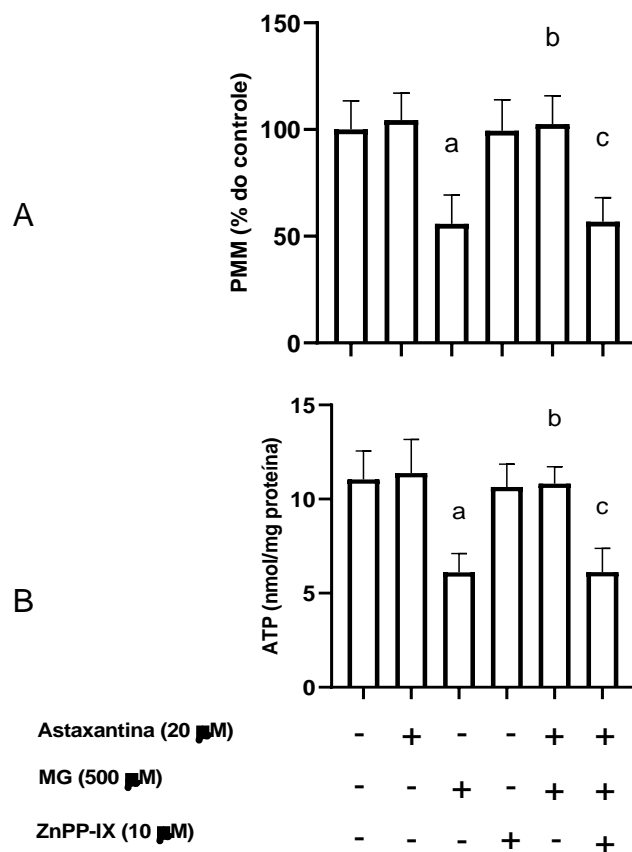


Figura 14: Ensaio de potencial de membrana (A) e análise dos níveis de ATP (B) observando o possível envolvimento de HO-1. As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST com 20 μ M por 24h e tratadas com MG 500 μ M por mais 24h. As células foram pré-tratadas com ZnPP-IX 10 μ M por 1h pelo mesmo período antes do tratamento com AST 20 μ M. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, (b) $p < 0,001$ comparados a células tratadas com MG e (c) $p < 0,0001$ comparada ao controle em ambos os testes.

Sabendo que estados inflamatórios podem ser causa ou consequência de desequilíbrio redox e alterações nos níveis de ATP, e que a enzima HO-1 exerce efeito anti-inflamatório em diferentes tipos celulares, investigamos se a AST seria capaz de induzir efeito anti-inflamatório nas células expostas ao MG, um agente pró-inflamatório (Farruggia et al., 2018; Oliveira et al., 2020). De acordo com as Fig. 14A e B, observa-se que o tratamento prévio com AST é capaz de atenuar o aumento na produção das

citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , respectivamente, nas células expostas ao MG ($p < 0,0001$ para ambos os parâmetros testados). Novamente, a inibição de HO-1 bloqueia o efeito promovido por AST nas células tratadas com MG ($p < 0,0001$ para ambos os casos).

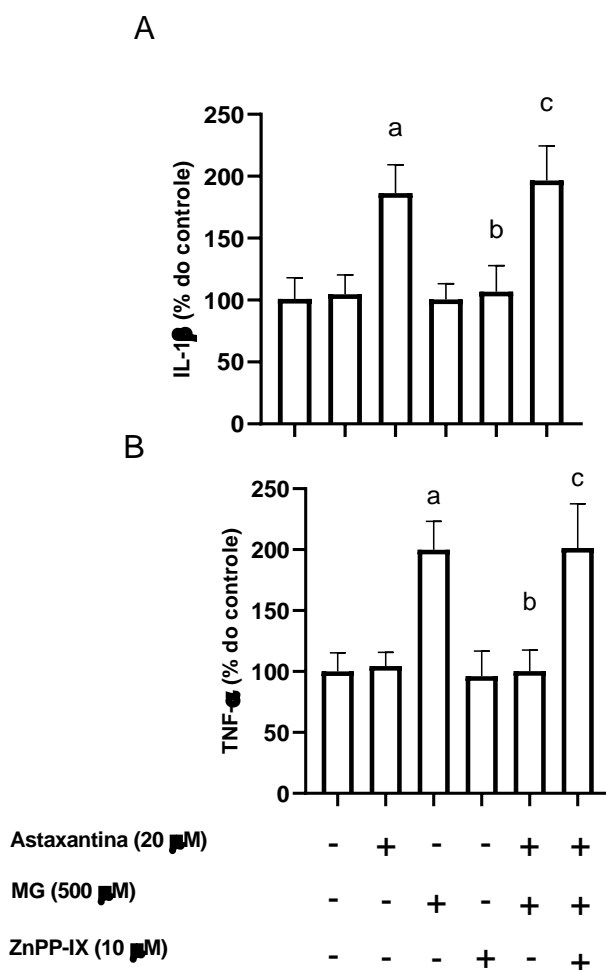


Figura 15: Ensaio de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (A) e TNF- α (B). As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST com 20 μ M por 24h e tratadas com MG 500 μ M por mais 24h. As células foram pré-tratadas com ZnPP-IX 10 μ M por 1h pelo mesmo período antes do tratamento com AST 20 μ M. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, (b) $p < 0,001$ comparados a células tratadas com MG e (c) $p < 0,0001$ comparada ao controle em ambos os testes.

A fim de confirmar o envolvimento da via BVR/HO-1 na citoproteção induzida por AST neste modelo experimental, expomos as células SH-SY5Y ao CORM-2 ou à BR, na presença de MG, e analisamos seu efeito sobre a viabilidade das mesmas.

Conforme mostrado na Fig. 15, tanto CORM-2 como BR diminuem o efeito de MG sobre a viabilidade celular ($p = 0,0126$ para ambas as moléculas testadas).

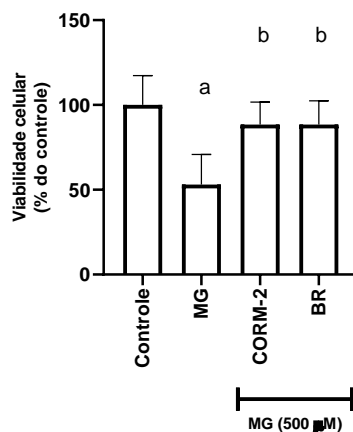


Figura 16: Ensaio de viabilidade das células SH-SY5Y com CORM-2 e BR antes da exposição ao MG. As células SH-SY5Y foram tratadas com CORM-2 ou BR e expostas ao MG 500 μ M por mais 24h. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, (b) $p < 0,05$ comparados a células tratadas com MG.

Finalmente, comparamos AST com outros agentes citoprotetores que agem por vias similares ou não quanto à viabilidade e ao estado energético das células SH-SY5Y. De acordo com a Fig. 16, tratamento prévio por 24 h com AST a 20 μ M diminui o efeito de MG sobre os níveis de ATP das células SH-SY5Y ($p < 0,05$ para as moléculas testadas) de forma bastante similar quando comparado com AC (1 μ M, 12 h antes de MG), SFN (5 μ M, 24 h antes de MG), NAC (10 mM, 1 h antes de MG) ou AG (250 μ M, 1 h antes de MG). Dados semelhantes foram observados quanto à viabilidade celular, conforme demonstrado na Fig. 17 ($p < 0,05$ para as moléculas testadas).

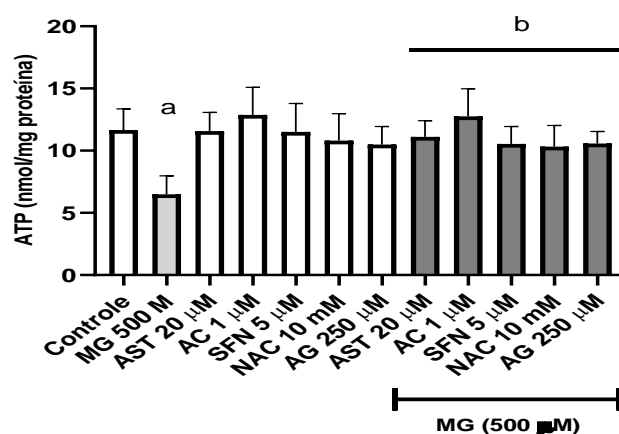


Figura 17: Ensaio de níveis de ATP em moléculas bioativas na presença de MG. As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST 20 μ M por 24h, ou AC 1 μ M por 12 h, ou SFN 5 μ M, 24h, ou NAC 10 mM, 1h, ou AG 250 μ M, 1h e posteriormente expostas ao MG 500 μ M por mais 24h. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, (b) $p < 0,05$ comparados a células tratadas com MG.

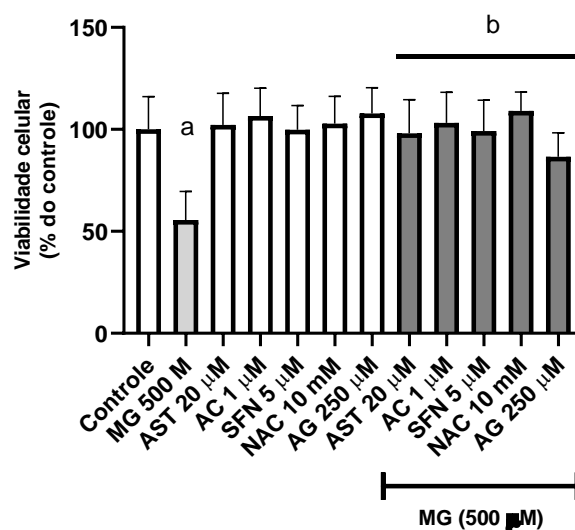


Figura 18: Ensaio de viabilidade das células SH-SY5Y na presença de moléculas bioativas expostas ao MG. As células SH-SY5Y foram pré-tratadas com AST 20 μ M por 24h, ou AC 1 μ M por 12 h, ou SFN 5 μ M, 24h, ou NAC 10 mM, 1h, ou AG 250 μ M, 1h e posteriormente expostas ao MG 500 μ M por mais 24h. Os dados mostrados são a média \pm o desvio padrão de cinco experimentos executados de forma independente e em triplicata. ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey, (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, (b) $p < 0,05$ comparados a células tratadas com MG.

PARTE III:
Discussão, Conclusão e Perspectivas futuras.

1. DISCUSSÃO

O MG, um dicarbonil bastante reativo e que apresenta fontes endógenas (como o próprio metabolismo de carboidratos, de alguns aminoácidos e de corpos cetônicos) e exógenas (como poluente atmosférico em diversos cenários), afeta a biologia redox celular tanto de forma direta quanto indireta (Kalapos, 2008a; Kalapos, 2013; de Oliveira et al., 2015). O metabolismo de MG gera espécies reativas que, ao caso se acumulem nas células, induzem dano redox em biomoléculas como lipídios e proteínas (Allaman et al., 2015; de Bari et al., 2020). Também é importante o consumo de GSH durante a biotransformação de MG por glioxalases (Thornalley, 2003). Embora a GSH seja utilizada, momentaneamente, em uma das reações envolvidas na formação de D-lactato a partir de MG, elevadas concentrações de MG podem comprometer, pelo menos em parte, a disponibilidade deste importante agente antioxidante, em células já afetadas por desequilíbrio redox (Kalapos, 2008b). O MG também causa disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, desequilíbrio redox (devido ao aumento na produção de espécies reativas por estas organelas) e colapso energético (devido aos efeitos sobre a síntese mitocondrial de ATP) (Pun e Murphy, 2012; Pun et al., 2014; de Souza et al., 2021). Desta forma, o MG vem sendo utilizado, em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, como um indutor de disfunção celular generalizada (Francisco et al., 2022). Ainda, MG pode induzir inflamação, processo estreitamente relacionado com disfunção mitocondrial e desequilíbrio redox em mamíferos (Hernandez-Castillo e Schuck, 2021). Por exemplo, o acúmulo de MG em neurônios cerebelares de ratos contribuiu para um estado de inflamação avançada encontrada em doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer (Frandsen et al., 2020). A exposição de células renais humanas (HK-2) ao MG por 24h ocasionou o aumento de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e interleucina 6 (IL-

6) (Kim et al., 2021). Contudo, além das modificações diretas de MG em macromoléculas, há também de forma indireta, através dos AGEs que podem modificar proteínas por meio da interação com os receptores específicos de glicação avançada (RAGE) e desencadear resposta inflamatória a nível celular (Allaman et al, 2015). Resultado obtido no tratamento de células β -pancreáticas com MG mostrou que RAGE regula negativamente as proteínas relacionadas à secreção de insulina e induz a inflamação (Chang et al., 2021).

De fato, níveis supra-fisiológicos de MG foram detectados em doenças nas quais os eventos celulares descritos são parte importante do mecanismo fisiopatológico, como diabetes *mellitus* tipos I e II, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer e doença de Parkinson (Biosa et al., 2018; de Bari et al., 2019 de Bari et al., 2020; Bora; Shankarrao, 2021; Hernandez-Castillo; Schuck, 2021; Toriumi et al., 2022). Inflamação também parece estimular um aumento nos níveis de MG em humanos (Zhang et al., 2021). O uso de MG, em modelos experimentais, visa, portanto, mimetizar algo comumente observado em doenças que afetam humanos e diminuem a expectativa e a qualidade de vida (Pignalosa et al., 2021). Ainda, desordens metabólicas como diabetes *mellitus* tipos I e II, parecem ter papel no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson, devido, também, às elevadas taxas de glicação observadas em diferentes compartimentos celulares, inclusive, nas mitocôndrias (de Bari et al., 2019; Hassan et al., 2020; Komici et al., 2021; Cheng et al., 2022).

Neste trabalho, mostramos que AST preveniu a queda de viabilidade celular, o desequilíbrio redox, o colapso bioenergético e o estado pró-inflamatório induzido por MG na linhagem dopaminérgica SH-SY5Y. AST estimulou a enzima HO-1 e a inibição

desta enzima bloqueou a citoproteção causada por esta xantofila nas células expostas ao MG. O co-tratamento com CORM-2 (uma molécula liberadora de CO) ou BR também foi eficaz em aliviar a queda de viabilidade celular causada por MG. Assim, sugere-se que o estímulo de HO-1 por AST levou a um aumento na produção de CO e de BR que não causou toxicidade às células e mediou a citoproteção promovida por AST no grupo experimental exposto ao MG. De fato, tanto CO quanto BR têm demonstrado efeito protetor em diferentes tipos celular (Funes et al., 2020; Stec e Hinds, 2020). BR é capaz de sequestrar peroxinitrito (ONOO^-), um agente causador de nitração de proteínas via reação com resíduos de tirosina (Jansen et al., 2010), e O_2^{\bullet} (Jansen e Daiber, 2012). Parfenova et al. (2012) demonstraram que CO induziu efeitos antioxidantes, por meio da redução na produção de espécies reativas, em vasos cerebrais e astrócitos corticais de leitões submetidos a um modelo experimental de convulsão. Resultados similares foram obtidos pelo mesmo grupo de pesquisa em um modelo experimental de asfixia neonatal prolongada em leitões (Parfenova et al., 2018). Da mesma forma, BR poderia estar envolvida tanto na prevenção de nitração de proteínas quanto de peroxidação lipídica ou carbonilação e oxidação de grupos tiol de proteínas, visto que O_2^{\bullet} , direta ou indiretamente (via conversão em H_2O_2 ou inibição de enzimas antioxidantes), é um agente indutor de danos moleculares bastante importantes em organismos aeróbicos (Sies et al., 2017). Neste contexto, evidenciamos que o pré-tratamento com AST diminuiu a oxidação de DCFH nas células expostas ao MG, indicando um papel para esta xantofila no controle da produção de espécies reativas. Além disso, AST preveniu o dano oxidativo causado por MG em lipídios (via diminuição nos níveis MDA, um marcador de peroxidação lipídica) e em proteínas (via redução dos níveis de grupos carbonil e da oxidação de grupos tiol).

A ação antioxidante estimulada por AST também pode ter sido dependente da habilidade desta molécula em prevenir a disfunção mitocondrial observada nas células expostas ao MG. As mitocôndrias são importantes fontes de espécies reativas em, praticamente, qualquer tipo celular nucleado (Murphy, 2009). Conforme demonstrado neste trabalho, os níveis de ATP e do PMM foram mantidos nas células expostas, previamente, à AST. Neste aspecto, AST também dependeu de HO-1 para promover proteção mitocondrial nas células tratadas com MG. Estes resultados estão de acordo com dados anteriormente publicados pelo grupo de pesquisas (Brasil et al., 2021) e por outros (Wang et al., 2010). Aparentemente, disfunção mitocondrial é parte importante em diferentes contextos clínicos, como em doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, bem como em desordens metabólicas nas quais MG apresenta papel relevante (resistência à insulina e diabetes mellitus tipos I e II, por exemplo) (Pun e Murphy, 2012; Sergi et al., 2019). MG é um potente indutor de glicação de proteínas tanto a nível celular quanto subcelular, afetando a função mitocondrial e levando a um colapso bioenergético acompanhado de desequilíbrio redox grave e morte celular (Allaman et al., 2015). Experimentalmente, observou-se que a exposição ao MG leva a um aumento na produção de O_2^{\bullet} pelas mitocôndrias de células humanas (Angeloni et al., 2015; de Oliveira et al., 2015; de Oliveira et al., 2017). Ainda, MG estimula a oxidação de biomoléculas componentes destas organelas, como lipídios e proteínas (de Oliveira et al., 2019). Sendo assim, a prevenção de lesão mitocondrial causada por AST não apenas estaria relacionada à manutenção do funcionamento das organelas quanto a uma ação antioxidante nas células expostas ao MG.

No entanto, AST também preveniu o estado pró-inflamatório causado por MG neste modelo experimental. Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias tanto estimulam a produção de espécies reativas quanto têm sua síntese promovida por estes agentes

(Mittal et al., 2014). Foi demonstrado que IL-1 β e TNF- α promoveram a produção de ERO pelas mitocôndrias e pela enzima NADPH oxidase em células pigmentadas de retina humana (Yang et al., 2007). Por outro lado, ERO podem modular a produção de citocinas pró-inflamatórias em células de mamíferos (Mathy-Hartert et al., 2002; Harijith et al., 2014). Desta forma, percebe-se algo que pode ser chamado de ciclo vicioso quanto à relação entre disfunção redox e inflamação, onde um fenômeno estimula o outro, retroalimentando-se (Bulua et al., 2011; Mittal et al., 2014). Se uma molécula é capaz de atuar como agente anti-inflamatório, é provável que a mesma induza uma ação antioxidante que pode ser consequência daquele efeito primário. De fato, AST vem sendo considerada como molécula anti-inflamatória em diversos modelos experimentais (Gao et al., 2021; Guo et al., 2021). Experimentalmente, o pré-tratamento com AST suprimiu citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α expostas ao peptídeo β -amilóide (Chang et al., 2010). Ainda, AST exerceu efeito preventivo quanto à indução de inflamação em modelo experimental de desordem metabólica em células hepáticas por meio da indução da enzima HO-1 (Galasso et al., 2018). Assim, sabe-se que há diversas moléculas de origem natural que atuam como antioxidantes e anti-inflamatórias, incluindo ácido carnósico (AC) e sulforafano (SFN), dentre outras (de Oliveira et al., 2018a; Kamal et al., 2022).

Um ponto relevante, em relação ao MG e a resposta imune celular, foi mostrado por Dhananjayana et al. (2017) em modelo experimental de indução de inflamação via exposição de macrófagos e micróglia a interferon- γ (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS). Os autores observaram aumento na produção de MG já a partir de 12 horas de tratamento com os agentes pró-inflamatórios em ambos os tipos celulares. Durante eventos de inflamação, a produção de MG pode aumentar devido à inibição da enzima glicolítica triose-fosfato isomerase (TFI) por NO $^{\bullet}$, cuja concentração está elevada,

favorecendo acúmulo de dihidroxiacetona-fosfato (Dimmeler et al., 1992; Hess et al., 2013). O NO^\bullet também inibe a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, da mesma via metabólica, suprimindo a formação de 1,3-bisfosfoglicerato a partir de gliceraldeído-3-fosfato e causando bloqueio da glicólise (Braun et al., 1994). A dihidroxiacetona fosfato acumulada sofre autooxidação, gerando MG (Braun et al., 1994). Em trabalhos anteriores, foi evidenciado que a exposição ao MG aumentou a produção de NO^\bullet em células SH-SY5Y (Brasil et al., 2022). Além disso, demonstrou-se elevação nos níveis de 3-nitrotirosina em membranas mitocondriais de células expostas ao MG, o que indica aumento na produção de ONOO^- (Brasil et al., 2022). ONOO^- surge após a reação de NO^\bullet com O_2^\bullet , e MG, de fato, é um indutor de aumento na produção mitocondrial de O_2^\bullet , conforme previamente publicado (Folkes et al., 2022). Além da fonte mitocondrial, O_2^\bullet é produzido pela enzima NADPH oxidase em eventos de inflamação (Sies et al.,). Assim, quando se inicia o processo inflamatório, há aumento na produção de NO^\bullet e na chance de MG ser produzido em maiores taxas quando comparado com células não estimuladas. Por outro lado, a exposição ao MG pode induzir inflamação, conforme demonstrado neste trabalho. Então, não se pode descartar a possibilidade de mais um ciclo vicioso, além daquele que envolve disfunção redox e inflamação, amplificador do processo de inflamação e que envolve este dicarbonil, o qual apresenta ricas fontes endógenas, tornando-o um alvo terapêutico importante em situações desta natureza.

Neste contexto, Tate et al. (2019) demonstrou que *MitoGamide*, uma molécula capaz de sequestrar MG nas mitocôndrias, induziu cardioproteção em modelo experimental de cardiomiopatia diabética espontânea em camundongos. Embora os autores não tenham demonstrado dados relativos à fisiologia mitocondrial ou à função imune naquele órgão, foi evidenciado que os animais tratados com *MitoGamide*

tiveram menor prejuízo na função cardíaca quando comparados aos animais que receberam apenas o veículo. Em um trabalho posterior, por outro lado, Park et al. (2020) demonstrou que MitoGamide atenuou o colapso bioenergético associado à disfunção mitocondrial e a glicação de proteínas dependente de MG não apenas no coração, mas em outros órgãos dos camundongos afetados pela cardiomiopatia diabética. Além disso, os autores demonstraram que MitoGamide é, após captação celular, internalizado nas mitocôndrias, organelas nas quais acumula-se, atingindo concentrações entre 300 e 1000 vezes maiores quando comparado com o nível citoplasmático. A produção de MG está aumentada em qualquer estado de hiperglicemia, na verdade (Allaman et al., 2015). No entanto, na diabetes *mellitus*, um conjunto de fatores favorece não apenas aumento na sua síntese como, também, acúmulo deste dicarbonil (Allaman et al., 2015). Assim, o MG age como um toxicante endógeno, conforme já discutido aqui, e colabora com a progressão daquela desordem metabólica (Kalapos, 1999).

O efeito citoprotetor induzido por AST nas células expostas ao MG foi comparado ao das moléculas de origem vegetal AC e SFN neste trabalho. Também comparou-se os efeitos de AST com aqueles de NAC e AG. AC e SFN foram selecionadas para comparação com AST porque são capazes de modular vias de sinalização celular de forma similar na linhagem SH-SY5Y. AC e SFN são importantes indutores de HO-1 via estímulo de Nrf2, conforme demonstrado por nosso grupo de pesquisas e outros (de Oliveira et al, 2015; de Oliveira et al, 2017; de Oliveira, 2018a). AC é um diterpeno e SFN um isotiocianato e ambos podem ser obtidos por humanos por meio da dieta, assim como a AST (Birtić et al., 2015; Houghton et al., 2016; de Oliveira et al., 2018b). AC apresenta dois grupos hidroxil O-fenólicos nos carbonos C11 e C12, o chamado grupamento catecol, importante característica química

associada a moléculas antioxidantes (Birtic et al., 2015). AC também é um agente pró-eletrofílico capaz de gerar, nas células pelas quais foi captado, um eletrofílico que interage com Nrf2, dentre outras proteínas, estimulando sua ativação e a promoção de citoproteção (Lin et al., 2015). SFN, por outro lado, contém um grupo 4-(metilsulfinil)butil ligado ao nitrogênio e pode ativar Nrf2 de forma direta por meio de uma ligação covalente com Keap1, a inibidora daquele fator de transcrição, promovendo sua liberação e posterior translocação para o núcleo celular, promovendo a expressão de enzimas de fases I e II de desintoxicação e antioxidantes (Hong et al., 2005). Assim como AST, AC e SFN, devido a características moleculares próprias, atuam, de forma majoritária, como antioxidantes indiretos, ou seja, estimulam a expressão de enzimas antioxidantes e a síntese de GSH, o mais importante antioxidante não-enzimático em humanos (Houghton et al., 2016; de Oliveira et al., 2018b). Além disso, AC e SFN estimulam a expressão de HO-1 nas células SH-SY5Y (Lee et al., 2013; de Oliveira et al., 2017). Também é importante mencionar que AC e SFN exibem ação anti-inflamatória neste mesmo tipo celular (de Oliveira et al., 2018a; de Oliveira et al., 2018b). Então, neste trabalho, observou-se que AST, AC e SFN induziram efeitos similares sobre a produção de ATP e a viabilidade das células tratadas com MG. No entanto, estas moléculas preveniram as disfunções causadas pelo MG em concentrações diferentes, sendo o AC aquela que exerceu a citoproteção em concentração mais baixa, conforme já publicado previamente (de Oliveira et al., 2015).

Por outro lado, embora AST, na concentração de 20 μ M, tenha prevenido as disfunções celulares e mitocondriais promovidas pelo MG, nenhum efeito citotóxico foi observado nas células expostas somente à xantofila. Isto mostra que, pelo menos neste modelo experimental *in vitro*, a AST é um bom agente promotor de proteção mitocondrial e celular. Na verdade, foi evidenciado, em trabalhos anteriores do grupo

e de outros, uma ação citoprotetora causada pela AST, que envolveu ações antioxidantes e anti-inflamatórias, bem como relacionadas à proteção mitocondrial, por meio de diferentes mecanismos moleculares (García et al., 2020; Brasil et al., 2021; Brasil et al., 2021).

Em relação à comparação de AST com NAC e AG, percebe-se, mais uma vez, que AST é um bom agente protetor, inclusive, em concentração muito mais baixa que os demais. NAC, uma molécula sintética, é um aminotiol que serve de precursor de cisteína e de GSH em células humanas (van Zandwijk, 1995). Assim, NAC desempenha um potente papel antioxidante, conforme demonstrado em diversos modelos experimentais (Mokhtari et al., 2017; Aldini et al., 2018). Além disso, NAC, AC e SFN apresentam uma semelhança redox quanto à indução da síntese de GSH, molécula fundamental para que o sistema de glioxalases transforme MG em D-lactato, molécula inerte que é excretada das células (Allaman et al., 2015; He et al., 2020). Diferentemente, AG é um sequestrador de MG e, por isso, diminui a chance deste dicarbonil em reagir com biomoléculas celulares, atenuando seus efeitos deletérios (Farhad et al., 2011). Por mecanismos diferentes, atuaram como citoprotetores neste modelo experimental. É pouco provável que AST tenha um papel como sequestradora de MG, por outro lado.

Neste contexto, AST é uma potente indutora de Erk1/2 (do inglês *extracellular signal-regulated kinases 1/2*) (Wang et al., 2010) e de PI3K/Akt (do inglês *phosphoinositide 3-kinase/Akt*) (Yan et al., 2016) em células SH-SY5Y. A ativação destas cinases por moléculas bioativas está, comumente, relacionada à sobrevivência das células expostas a diferentes tipos de estressores (Karmakar et al., 2011; Rai et al., 2019; Long et al., 2021). Por exemplo, nosso grupo demonstrou, previamente, que a via de sinalização celular PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 foi estimulada por AST em células SH-

SY5Y, protegendo estas de lesões moleculares provocadas por H₂O₂ (Brasil et al., 2021). No entanto, ainda resta saber se estas vias de sinalização celular fariam parte do mecanismo de ação pelo qual o pré-tratamento com AST protegeu as células da exposição ao MG no presente modelo experimental.

2. CONCLUSÃO

Em suma, observamos que AST preveniu as disfunções celulares e mitocondriais causadas por MG neste modelo experimental. Embora o mecanismo de ação exato não tenha sido demonstrado, percebe-se que a proteção mitocondrial causada por AST pode ter um papel estratégico em mediar a promoção de benefícios gerais aqui relatados. Espera-se, futuramente, que seja possível investigar o envolvimento de vias de sinalização celular nos efeitos promovidos por AST em outros modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Este último, principalmente, seria fundamental para estudar o comportamento de AST no organismo mamífero, pois sua biodisponibilidade é, assim como de todas as moléculas de origem natural, limitada, e isto afeta a capacidade de esta molécula exercer benefícios às células de diferentes órgãos.

3. PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretendemos, futuramente, investigar o envolvimento de vias de sinalização celular na mediação dos efeitos citoprotetores promovidos por AST em células humanas. Pesquisar a capacidade de AST em estimular proteção mitocondrial por meio da modulação da dinâmica mitocondrial e/ou da indução de biogênese mitocondrial. Ainda, analisar os efeitos de AST em modelos experimentais *in vivo* de disfunção mitocondrial, verificando o impacto da limitada biodisponibilidade desta molécula em organismos complexos.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ADAMS L, FRANCO MC, ESTEVEZ AG. **Reactive nitrogen species in cellular signaling.** *Exp Biol Med* (Maywood). 2015 Jun;240(6):711-7. doi: 10.1177/1535370215581314. Epub 2015 Apr 16. PMID: 25888647; PMCID: PMC4935209.

ALLAMAN I, BÉLANGER M, MAGISTRETTI PJ. **Methylglyoxal, the dark side of glycolysis.** *Front Neurosci.* 2015;9:23. Published 2015 Feb 9. doi:10.3389/fnins.2015.00023.

ALDINI G, ALTOMARE A, BARON G, VISTOLI G, CARINI M, BORSANI L, SERGIO F. **N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why.** *Free Radic Res.* 2018 Jul;52(7):751-762. doi: 10.1080/10715762.2018.1468564. Epub 2018 May 9. PMID: 29742938.

AMBATI R. R.; PHANG S. M.; RAVI S.; ASWATHANARAYANA R. G. **Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review.** *Mar Drugs.* 2014;12(1):128-152. Published 2014 Jan 7. doi:10.3390/md12010128.

ANGELONI, C.; MALAGUTI, M.; RIZZO, B.; BARBALACE, M. C.; FABBRI, DANIELE; HRELIA, S. **Neuroprotective Effect of Sulforaphane against Methylglyoxal Cytotoxicity.** *Chemical Research in Toxicology*, 2015, 28(6), 1234–1245. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b0.

BAUER, I. RENSING, H.; FLORAX, A.; ULRICH, C.; PISTORIUS, G.; REDL, H.; BAUER, M. (2003). **Expression Pattern and Regulation of Heme Oxygenase-1/Heat Shock Protein 32 in Human Liver Cells.** *Shock* (Augusta, Ga.). 20. 116-22. 10.1097/01.shk.0000075568.93053.fa.

BARBOSA, K. BARRA, F. et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** *Revista de Nutrição [online].* 2010, v. 23, n. 4 [Acessado 30 Março 2021] , pp. 629-643.

BARREIROS, ANDRÉ L. B. S., DAVID, JORGE M. E DAVID, JUCENI P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** *Química Nova [online].* 2006, v. 29, n. 1 [Acessado 16 Agosto 2021] , pp. 113-123.

BIOSA A, OUTEIRO TF, BUBACCO L, BISAGLIA M. **Diabetes Mellitus as a Risk Factor for Parkinson's Disease: a Molecular Point of View.** *Mol Neurobiol.* 2018 Nov;55(11):8754-8763. doi: 10.1007/s12035-018-1025-9. Epub 2018 Mar 28. PMID: 29594935.

BORA S, SHANKARRAO ADOLE P. **Carbonyl stress in diabetics with acute coronary syndrome.** *Clin Chim Acta.* 2021 Sep;520:78-86. doi: 10.1016/j.cca.2021.06.002. Epub 2021 Jun 6. PMID: 34090879.

BRAS, DANIELA, F. R. **A deficiência na enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase - Sensibilidade a fármacos.** *Dissertação de Mestrado*, 2017.

BUETTNER, GARRY R. **Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide.** *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 11 4 (2011): 341-6 .

BULUA, A. C.; SIMON, A.; MADDIPATI, R.; PELLETIER, M.; PARK, H.; KIM, K.-Y.; SACK, M. N.; KASTNER, D. L.; SIEGEL, R. M. **Mitochondrial reactive oxygen**

species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). Journal of Experimental Medicine, 2011. Vol 208(3), p. 519–533. doi:10.1084/jem.20102049.

BRAUN L, GARZÓ T, RIBA P, MANDL J, KALAIPOS MP. **Methylglyoxal and cell viability.** The International Journal of Biochemistry. 1994 Aug;26(8):987-990. DOI: 10.1016/0020-711x(94)90069-8. PMID: 8088418.

BRASIL, FLÁVIA B.; ALMEIDA, FHELPE J. S.; LUCKACHAKI, MATHEUS D.; DALL'OGGIO, EVANDRO LUIZ.; DE OLIVEIRA, MARCOS R. **Astaxanthin prevents mitochondrial impairment in the dopaminergic SH-SY5Y cell line exposed to glutamate-mediated excitotoxicity: Role for the Nrf2/HO-1/CO-BR axis.** European Journal of Pharmacology. Volume 908, 2021.

BRASIL FB, BERTOLINI GOBBO RC, SOUZA DE ALMEIDA FJ, LUCKACHAKI MD, DALL'OGGIO EL, DE OLIVEIRA MR. **The signaling pathway PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 plays a role in the mitochondrial protection promoted by astaxanthin in the SH-SY5Y cells exposed to hydrogen peroxide.** Neurochem Int. 2021 Jun;146:105024. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105024. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33775716.

BRASIL FB, DE ALMEIDA FJS, LUCKACHAKI MD, DALL'OGGIO EL, DE OLIVEIRA MR. **The C-glucosyl flavone isoorientin pretreatment attenuates the methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role for the AMPK-PI3K/Akt/Nrf2/γ-GCL/GSH axis.** Metab Brain Dis. 2022 Mar 22. doi: 10.1007/s11011-022-00966-x. Epub ahead of print. PMID: 35316449.

BIRTIĆ S, DUSSORT P, PIERRE FX, BILY AC, ROLLER M. **Carnosic acid. Phytochemistry.** 2015 Jul;115:9-19. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.12.026. Epub 2015 Jan 29. PMID: 25639596.

CERQUEIRA, F. M. MEDEIROS, M. H. G.; OHARA, A. **Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas.** Química Nova [online]. 2007, v. 30, n. 2 pp. 441-449. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200036>>. Acesso em 15 dezembro 2021.

CRUVINEL, W. M. et al. **Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response.** Revista Brasileira de Reumatologia [online]. 2010, v. 50, n. 4 , pp. 434-447. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>>. Acesso em 12 dezembro 2021.

CHENG D, YANG S, ZHAO X, WANG G. **The Role of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists (GLP-1 RA) in Diabetes-Related Neurodegenerative Diseases.** Drug Des Devel Ther. 2022;16:665-684. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S348055>.

CHANG CH, CHEN CY, CHIOU JY, PENG RY, PENG C H. **Astaxantina garantiu a morte apoptótica de células PC12 induzida pelo peptídeo β-amilóide: Seus alvos de ação molecular.** J. Med. Comida. 2010; 13 :548-556. doi: 10.1089/jmf.2009.1291.gao

DAVINELLI S, NIELSEN ME, SCAPAGNINI G. **Astaxanthin em Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review.** Nutrientes. 2018; 10 (4): 522. Publicado em 22 de abril de 2018. doi: 10.3390 / nu10040522.

de BARI L, ATLANTE A, ARMENI T, KALAIPOS MP. **Synthesis and metabolism of methylglyoxal, S-D-lactoylglutathione and D-lactate in cancer and Alzheimer's disease.** Exploring the crossroad of eternal youth and premature aging. *Ageing Res Rev.* 2019 Aug;53:100915. doi: 10.1016/j.arr.2019.100915. Epub 2019 Jun 4. PMID: 31173890.

de BARI L, SCIRÈ A, MINNELLI C, CIANFRUGLIA L, KALAIPOS MP, ARMENI T. **Interplay among Oxidative Stress, Methylglyoxal Pathway and S-Glutathionylation.** *Antioxidants (Basel).* 2020 Dec 28;10(1):19. doi: 10.3390/antiox10010019. PMID: 33379155; PMCID: PMC7824032.

de OLIVEIRA, M. R.; FERREIRA, G. C.; SCHUCK, P. F.; DAL BOSCO, S. **Role for the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway in the protective effects of carnosic acid against methylglyoxal-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells.** *Chemico-Biological Interactions,* 2015, 242, 396–406. doi:10.1016/j.cbi.2015.11.003.

de OLIVEIRA, MARCOS R.; NABAVI, SEYED F.; MANAVI, A.; HAJHEYDARI, Z.; NABAVI, SEYED M. **Resveratrol and the mitochondria:** From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* Vol. 1860, Edição 4, 2016. P 727-745.

de OLIVEIRA, M. R.; DE SOUZA, I. C. C.; FÜRSTENAU, C. R. **Carnosic Acid Induces Anti-Inflammatory Effects in Paraquat-Treated SH-SY5Y Cells Through a Mechanism Involving a Crosstalk Between the Nrf2/HO-1 Axis and NF-κB.** *Molecular Neurobiology,* p. 1–8, 2017.

de OLIVEIRA, M. R. **Carnosic acid as a promising agent in protecting mitochondria of brain cells.** *Molecular Neurobiology,* v. 55, n. 8, p. 6687–6699, 2018a.

de OLIVEIRA MR, BRASIL FB, FÜRSTENAU CR. **Sulforaphane Attenuated the Pro-Inflammatory State Induced by Hydrogen Peroxide in SH-SY5Y Cells Through the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway.** *Neurotox Res.* 2018 Aug;34(2):241-249. doi: 10.1007/s12640-018-9881-7. Epub 2018b, Feb 23.

de OLIVEIRA, M R; CUSTODIO S, I C; FÜRSTENAU, C R. **Promotion of mitochondrial protection by naringenin in methylglyoxal-treated SH-SY5Y cells: Involvement of the Nrf2/GSH axis.** *Chemico-Biological Interactions,* 2019. vol 310. doi:10.1016/j.cbi.2019.108728.

de OLIVEIRA, MR, DE SOUZA, ICC; FÜRSTENAU, CR **Proteção Mitochondrial Promovida pelo Diterpeno Kahweol do Café em Células SH-SY5Y de Neuroblastoma Humano Tratados com Metilglioxal.** *Neurotox Res* 37, 100-110. 2020.

de SOUZA ICC, GOBBO RCB, DE ALMEIDA FJS, LUCKACHAKI MD, DE OLIVEIRA MR. **Carnosic acid depends on glutathione to promote mitochondrial protection in methylglyoxal-exposed SH-SY5Y cells.** *Metab Brain Dis.* 2021 Mar;36(3):471-481. doi: 10.1007/s11011-020-00651-x. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33411218.

DIMMELER S, **Nitric-Oxide Causes Adp-Ribosylation and Inhibition of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase,** *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 267: 16771 (1992).

DHANANJAYAN K, GUNAWARDENA D, HEARN N, SONNTAG T, MORAN C, GYENGESI E, SRIKANTH V, MÜNCH G. **Activation of Macrophages and Microglia by Interferon- γ and Lipopolysaccharide Increases Methylglyoxal Production: A New Mechanism in the Development of Vascular Complications and Cognitive Decline in Type 2 Diabetes Mellitus?** J Alzheimers Dis. 2017;59(2):467-479. doi: 10.3233/JAD-161152. PMID: 28582854.

EISNER V, PICARD M, HAJNÓCZKY G. **Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses.** Nat Cell Biol. 2018 Jul;20(7):755-765. doi: 10.1038/s41556-018-0133-0. Epub 2018 Jun 27. PMID: 29950571; PMCID: PMC6716149.

ENGERS, VANESSA K.; BEHLING, CAMILE S.; FRIZZO, MATIAS N. **A Influência do Estresse Oxidativo no Processo de Envelhecimento Celular.** Revista Contexto & Saúde, Ijuí. v. 10, n. 20, Jan./Jun. 2011.

FARHAD AR, RAZAVI SM, NEJAD PA. **The use of aminoguanidine, a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, to evaluate the role of nitric oxide on periapical healing.** Dent Res J (Isfahan). 2011 Oct;8(4):197-202. doi: 10.4103/1735-3327.86038. PMID: 22135691; PMCID: PMC3221087

FRANCISCO FA, SAAVEDRA LPJ, FERREIRA-JUNIOR MD, CAVALCANTE KVN, MOREIRA VM, PRATES KV, BORGES SC, BUTTOW NC, RIBEIRO TA, PEDRINO GR, XAVIER CH, MATAFOME P, DE FREITAS MATHIAS PC, GOMES RM. **Early postnatal exposure of rat pups to methylglyoxal induces oxidative stress, inflammation and dysmetabolism at adulthood.** J Dev Orig Health Dis. 2022 Jan 21:1-9. doi: 10.1017/S204017442100074X. Epub ahead of print. PMID: 35057878.

FOLKES LK, BARTESAGHI S, TRUJILLO M, WARDMAN P, RADI R. **Radiolysis Studies of Oxidation and Nitration of Tyrosine and Some Other Biological Targets by Peroxynitrite-Derived Radicals.** International Journal of Molecular Sciences. 2022 Feb;23(3). DOI: 10.3390/ijms23031797. PMID: 35163717; PMCID: PMC8836854.

FUNES SC, RIOS M, FERNÁNDEZ-FIERRO A, COVIÁN C, BUENO SM, RIEDEL CA, MACKERN-OBERTI JP; KALERGIS AM. **Naturally Derived Heme-Oxygenase 1 Inducers and Their Therapeutic Application to Immune-Mediated Diseases.** Frontiers in Immunology. Volume 11, Article 146. 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.01467.

GALASSO, C., OREFICE, I., PELLONE, P., CIRINO, P., MIELE, R., IANORA, A., BRUNET, C., & SANSONE, C. **On the Neuroprotective Role of Astaxanthin: New Perspectives?** Marine Drugs. 2018, 16 (8), 247. <https://doi.org/10.3390/md16080247>.

GAO, F., WU, X., MAO, X., NIU, F., ZHANG, B., DONG, J., & LIU, B. **Astaxanthin provides neuroprotection in an experimental model of traumatic brain injury via the Nrf2/HO-1 pathway** Jornal americano de pesquisa translacional, 2021 13 (3), 1483-1493.

GARCÍA F, LOBOS P, PONCE A, CATALDO K, MEZA D, FARIÁS P, ESTAY C, OYARZUN-AMPUERO F, HERRERA-MOLINA R, PAULA-LIMA A, ARDILES ÁO, HIDALGO C, ADASME T, MUÑOZ P. **Astaxanthin Counteracts Excitotoxicity and Reduces the Ensuing Increases in Calcium Levels and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation.** Mar Drugs. 2020 Jun 26;18(6):335. doi: 10.3390/md18060335. PMID: 32604880; PMCID: PMC7345213.

GHIGGI, V. **Estudo do Crescimento e Indução da Produção do Pigmento Astaxantina por *Haematococcus pluvialis***. Dissertação de Mestrado, 2021.

HALLIWELL B. **Reactive species and antioxidants**. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):312-22. doi: 10.1104/pp.106.077073. PMID: 16760481; PMCID: PMC1475431.

GUO S, GUO L, FANG Q, YU M, ZHANG L, YOU C, WANG X, LIU Y, HAN C. A astaxantina protege contra lesão renal aguda precoce em ratos gravemente queimados pela inativação do eixo TLR4/MyD88/NF-κB e regulação positiva da heme oxigenase-1. *Rep. Sci.* 23 de março de 2021;11(1):6679. doi: 10.1038/s41598-021-86146-w. Errata em: *Sci Rep.* 2022 Jan 12;12(1):921. PMID: 33758309; PMCID: PMC7988001.

HARIJITH, A; EBENEZER, D L.; NATARAJAN, V. **Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation**. *Frontiers in Physiology*, 2014, vol 5. doi:10.3389/fphys.2014.00352

HASSAN A, SHARMA KANDEL R, MISHRA R, GAUTAM J, ALAREF A, JAHAN N. **Diabetes Mellitus and Parkinson's Disease: Shared Pathophysiological Links and Possible Therapeutic Implications**. *Cureus.* 2020 Aug 18;12(8):e9853. doi: 10.7759/cureus.9853. PMID: 32832307; PMCID: PMC7437092.

HE Y, ZHOU C, HUANG M, TANG C, LIU X, YUE Y, DIAO Q, ZHENG Z, LIU D. **Glyoxalase system**: A systematic review of its biological activity, related-diseases, screening methods and small molecule regulators. *Biomed Pharmacother.* 2020 Nov;131:110663. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110663. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32858501.

HESS C, STRATMANN B, QUESTER W, TSCHOEPE D, MADEA B, MUSSHOF F. **Clinical and forensic examinations of glycaemic marker methylglyoxal by means of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *Int J Legal Med.* 2013 Mar;127(2):385-93. doi: 10.1007/s00414-012-0740-4. Epub 2012 Jul 21. PMID: 22820652.

HERNANDEZ-CASTILLO C; SHUCK SC. **Diet and Obesity-Induced Methylglyoxal Production and Links to Metabolic Disease**. *Chem. Res. Toxicol.* 2021, nº 34, vol 12, p. 2424–2440.

HETTIARACHCHI, N., DALLAS, M., AL-OWAIS, M., GRIFFITHS, H., HOOPER, N., SCRAGG, J., ... PEERS, C. **Heme oxygenase-1 protects against Alzheimer's amyloid-beta(1–42)-induced toxicity via carbon monoxide production**. *Cell Death & Disease*, 5, e1569, 2014

HIGUERA-CIAPARA I.; FÉLIX-VALENZUELA L.; GOYCOOLEA, F. M. **Astaxanthin**: A Review of its Chemistry and Applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006. 46:2, 185-196, DOI: 10.1080/10408690590957188

HOUGHTON CA, FASSETT RG, COOMBES JS. **Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators**: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7857186. doi: 10.1155/2016/7857186. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26881038; PMCID: PMC4736808.

HONG F, FREEMAN ML, LIEBLER DC. **Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane**. *Chem Res Toxicol.* 2005 Dec;18(12):1917-26. doi: 10.1021/tx0502138. PMID: 16359182.

HUBER, PAULA C., ALMEIDA, WANDA P. E FÁTIMA, ÂNGELO. **Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos.** Química Nova [online]. 2008, v. 31, n. 5, pp. 1170-1179.

HUSSAIN T, TAN B, YIN Y, BLACHIER F, TOSSOU MC, RAHU N. **Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?** Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:7432797. doi: 10.1155/2016/7432797. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27738491; PMCID: PMC5055983.

HWANG YP, KIM HG, HAN EH, JEONG HG. **Metallothionein-III protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a PI3K and ERK/Nrf2-dependent manner.** Toxicol Appl Pharmacol. 2008 Sep 15;231(3):318-27. doi: 10.1016/j.taap.2008.04.019. Epub 2008 May 2. PMID: 18554677.

JANSEN T; HORTMANN M; OELZE M; OPITZ B; STEVEN S; SCHELL R; KNORR M; KARBACH S; SCHUHMACHER S; WENZEL P; MÜNDEL T; DAIBER A. **Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1—evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin.** Frontiers in Physiology. Vol. 49(2). 2010. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.04.011.

JANSEN, T; DAIBER, A. **Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase?.** Frontiers in Pharmacology, vol 3. 2012. doi:10.3389/fphar.2012.00030.

KAUSAR S.; WANG F.; CUI H. **The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases.** Cells. 2018;7(12):274. Published 2018 Dec 17. doi:10.3390/cells7120274.

KALAPOUS MP. **Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications.** Toxicol Lett. 1999 Nov 22;110(3):145-75. doi: 10.1016/s0378-4274(99)00160-5. PMID: 10597025.

KALAPOUS MP. **Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research.** Drug Metabol Drug Interact. 2008a;23(1-2):69-91. doi: 10.1515/dmdi.2008.23.1-2.69. PMID: 18533365.

KALAPOUS MP. **The tandem of free radicals and methylglyoxal.** Chem Biol Interact. 2008b Feb 15;171(3):251-71. doi: 10.1016/j.cbi.2007.11.009. Epub 2007 Nov 24. PMID: 18164697.

KALAPOUS MP. **Where does plasma methylglyoxal originate from?** Diabetes Res Clin Pract. 2013 Mar;99(3):260-71. doi: 10.1016/j.diabres.2012.11.003. Epub 2012 Dec 1. PMID: 23206674.

KAMAL RM, ABDULL RAZIS AF, MOHD SUKRI NS, et al. **Beneficial Health Effects of Glucosinolates-Derived Isothiocyanates on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases.** Molecules. 2022;27(3):624. Published 2022 Jan 19. doi:10.3390/molecules27030624

KARMARKAR SW, BOTTUM KM, KRAGER SL, TISCHKAU SA. **ERK/MAPK is essential for endogenous neuroprotection in SCN2.2 cells.** PLoS One. 2011;6(8):e23493. doi: 10.1371/journal.pone.0023493. Epub 2011 Aug 17. PMID: 21858143; PMCID: PMC3157406.

KIM S. H; KIM H. **Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review**. *Nutrients*. 2018;10(9):1137. Published 2018 Aug 21. doi:10.3390/nu10091137.

KOMICI K, FEMMINELLA GD, BENCIVENGA L, RENGO G, PAGANO G. **Diabetes Mellitus and Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analyses**. *J Parkinsons Dis*. 2021;11(4):1585-1596. doi: 10.3233/JPD-212725. PMID: 34486987.

MURPHY, M P. **How mitochondria produce reactive oxygen species**. *Biochem. J.*, 2009. Vol 417(1), 1–13. doi:10.1042/bj20081386

LEE C, PARK GH, LEE SR, JANG JH. **Attenuation of β -amyloid-induced oxidative cell death by sulforaphane via activation of NF-E2-related factor 2**. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:313510. doi: 10.1155/2013/313510. Epub 2013 Jun 20. PMID: 23864927; PMCID: PMC3705986.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

LI NA; LI S.; ZHANG Y. J.; XU X. R.; CHEN Y M.; LI H. B. **Resources and biological activities of natural polyphenols**. *Nutrients*. 2014;6(12):6020-6047. Published 2014 Dec 22. doi:10.3390/nu6126020

LIMA, D. et al. **Aluminum exposure promotes histopathological and pro-oxidant damage to the prostate and gonads of male and female adult gerbils**. *Experimental and Molecular Pathology*, Volume 116, 2020, ISSN 0014-4800, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104486>.

LIN C-Y, WU C-R, CHANG SW, WANG YJ, WU JJ, TSAI CW. **Induction of the pi class of glutathione S-transferase by carnosic acid in rat Clone 9 cells via the p38/Nrf2 pathway**. *Journal Food & Function*, Issue 6, 2015.

LONG HZ, CHENG Y, ZHOU ZW, LUO HY, WEN DD, GAO LC. **PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease**. *Front Pharmacol*. 2021 Apr 15;12:648636. doi: 10.3389/fphar.2021.648636. PMID: 33935751; PMCID: PMC8082498

LOURENÇO, SOFIA C; MOLDÃO-MARTINS M, ALVES V. D. **Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications**. *Molecules*. 2019;24(22):4132. Published 2019 Nov 15. doi:10.3390/molecules24224132.

LU, JIAN-MING; LIN, PETER H; YAO, QIZHI; CHEN, CHANGYI. **Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems**. *J Cell Mol Med*. Abril de 2010; 14 (4): 840–860, 2010.

MARTELLI, FELIPE; NUNES, FRANCIS M. F. **Radicais livres: em busca do equilíbrio**. *Cienc. Cult.* vol.66 n.3 São Paulo. Setembro, 2014.

MARZZOCO, ANITA; TORRES, BAYARDO. **Bioquímica Básica**. 4º ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2015

MATHY-HARTERT M.; DEBY-DUPONT G.P; REGINSTER J.-Y.L.; AYACHE N.; PUJOL J.-P.; HENROTIN Y.E. **Regulation by reactive oxygen species of interleukin-1 β , nitric oxide and prostaglandin E2 production by human chondrocytes**. *Osteoarthritis research*, 2002, vol 10(7), p. 547–555. doi:10.1053/joca.2002.0789

MITTAL, M; SIDDIQUI, M R; TRAN, K; REDDY, S P.; MALIK, A B. **Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury**. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014. Vol 20(7), p. 1126–1167. doi:10.1089/ars.2012.5149.

MO L, YANG C, GU M, ZHENG D, LIN L, WANG X, LAN A, HU F, FENG J. **PI3K/Akt signaling pathway-induced heme oxygenase-1 upregulation mediates the adaptive cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against oxidative injury in PC12 cells**. *Int J Mol Med*. 2012 Aug;30(2):314-20. doi: 10.3892/ijmm.2012.1002. Epub 2012 May 14. PMID: 22614123.

MOKHTARI V, AFSHARIAN P, SHAHHOSEINI M, KALANTAR SM, MOINI A. **A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine**. *Cell J*. 2017 Apr-Jun;19(1):11-17. doi: 10.22074/cellj.2016.4872. Epub 2016 Dec 21. PMID: 28367412; PMCID: PMC5241507.

NUNNARI, JODI; SUOMALAINEN, ANU. **Mitocôndria: na doença e na saúde**. *Cell*. 2012; 148 (6): 1145-1159.

OSTROW JD, TIRIBELLI C. **Bilirubin, a curse and a boon**. *Gut*. 2003 Dec;52(12):1668-70. doi: 10.1136/gut.52.12.1668. PMID: 14633940; PMCID: PMC1773881.

PARFENOVA, H; LEFFLER, C W; BASUROY, S; LIU, J; FEDINEC, A L. **Antioxidant roles of heme oxygenase, carbon monoxide, and bilirubin in cerebral circulation during seizures**. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(6), 1024–1034. 2012. doi:10.1038/jcbfm.2012.13.

PARFENOVA, H; POURCYROUS, M; FEDINEC, A L; LIU, J; BASUROY, S; LEFFLER, C W. **Astrocyte-Produced Carbon Monoxide (CO) and the CO Donor CORM-A1 Protect Against Cerebrovascular Dysfunction Caused by Prolonged Neonatal Asphyxia**. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2018.. doi:10.1152/ajpheart.00140.2018.

PARK M, NISHIMURA T, BAEZA-GARZA CD, CALDWELL ST, PUN PBL, PRAG HA, YOUNG T, SAUCHANKA O, LOGAN A, FORKINK M, GRUSZCZYK AV, PRIME TA, ARNDT S, NAUDI A, PAMPLONA R, COUGHLAN MT, TATE M, RITCHIE RH, CAICCI F, KALUDERCIC N, DI LISA F, SMITH RAJ, HARTLEY RC, MURPHY MP, KRIEG T. **Confirmation of the Cardioprotective Effect of MitoGamide in the Diabetic Heart**. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2020 Dec;34(6):823-834. doi: 10.1007/s10557-020-07086-7. Epub 2020 Sep 26. PMID: 32979176; PMCID: PMC7674384.

PUN PB, LOGAN A, DARLEY-USMAR V, CHACKO B, JOHNSON MS, HUANG GW, ROGATTI S, PRIME T. A., METHNER C, KRIEG T, FEARNLEY IM. **A mitochondria-targeted mass spectrometry probe to detect glyoxals: implications for diabetes**. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 67, 2014, Pages 437-450, ISSN 0891-5849. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.025>.

PIGNALOSA FC, DESIDERIO A, MIRRA P, et al. **Diabetes and Cognitive Impairment: A Role for Glucotoxicity and Dopaminergic Dysfunction**. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12366. Published 2021 Nov 16. doi:10.3390/ijms222212366

PUBCHEM Compound Summary for CID 5281224, **Astaxanthin**. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Astaxanthin>>. Acesso: Sept. 13, 2021.

PODEROSO J. J; CARRERAS, C; CONSTANZA L.; RIOBÓ N.; SCHÖPFER F.; BOVERIS A. **Nitric Oxide Inhibits Electron Transfer and Increases Superoxide Radical Production in Rat Heart Mitochondria and Submitochondrial Particles.** 1996, 328(1), 0–92. doi:10.1006/abbi.1996.0146

PUN PB, MURPHY MP. **Pathological significance of mitochondrial glycation.** Int J Cell Biol. 2012;2012:843505. doi: 10.1155/2012/843505. Epub 2012 Jun 21. PMID: 22778743; PMCID: PMC3388455.

PFANNER, NIKOLAS; WARSCHEID, BETTINA; WIEDEMANN, NILS. **Proteínas mitocondriais: da biogênese às redes funcionais.** Nat Rev Mol Cell Biol. Maio de 2021; 22 (5): 367]. Nat Rev Mol Cell Biol . 2019; 20 (5): 267-284.

PRESTES, A. S. **Estudo da Toxicidade Induzida por Metilglioxal em Células Sanguíneas Humanas: efeito protetor do *Syzygium cumini*.** Tese de doutorado, UFMS, 2017.

RAHAL A, KUMAR A, SINGH V, YADAV B, TIWARI R, CHAKRABORTY S, DHAMA K. **Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay.** Biomed Res Int. 2014;2014:761264. doi: 10.1155/2014/761264. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24587990; PMCID: PMC3920909.

RYTER S. W.. **Significance of Heme and Heme Degradation in the Pathogenesis of Acute Lung and Inflammatory Disorders.** International journal of molecular sciences, 22(11), 5509, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22115509>.

RYTER, S. W.; CHOI, A. M K. **Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation.** Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine vol. 167,1 (2016): 7-34. doi:10.1016/j.trsl.2015.06.011.

SERGI, D; NAUMOVSKI, N; HEILBRONN, L K; ABEYWARDENA, M; O'CALLAGHAN, N; LIONETTI, L; LUSCOMBE-MARSH, N. **Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet.** Frontiers in Physiology, 2019. Vol 10, article 532. doi:10.3389/fphys.2019.00532

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. **Oxidative Stress.** The Annual Review of Biochemistry, v. 86, p. 715–48, 2017.

RAI SN, DILNASHIN H, BIRLA H, SINGH SS, ZAHRA W, RATHORE AS, SINGH BK, SINGH SP. **The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders.** Neurotox Res. 2019 Apr;35(3):775-795. doi: 10.1007/s12640-019-0003-y. Epub 2019 Feb 1. PMID: 30707354

SANAJOU, S, ŞAHIN G BAYDAR, T. **Aluminium in cosmetics and personal care products.** Journal of Applied Toxicology. 2021. 41. 10.1002/jat.4228.

SARNIAK, A.; LIPÍŃSKA J.; TYTMAN K.; LIPÍŃSKA, A. **Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation.** Postepy Hig Med Dosw (online), 2016; 70: 1150-1164 e-ISSN 1732-2693.

SCHÖLER, C. M.; ZAVARIZE, L. D.; BOCK, P. M. **EXERCÍCIOS FÍSICOS NO COMBATE AO SOBREPESO E OBESIDADE: INTENSIDADE VERSUS ESTRESSE OXIDATIVO..** BIOCÊNCIAS E SAÚDE, V. 18, N. 36, 2016.

SOUZA, D. G. **Caracterização do papel da enzima heme-oxigenase I (HO-1) na rota da apoptose.** Dissertação de Mestrado. UFRGS. 2007.

SMITH, C., MARKS, A.D., LIEBERMAN, M. **Bioquímica médica básica de Marks**. Uma abordagem clínica. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 980p.

STEC, DAVID E.; HINDS, TERRY D. **Natural Product Heme Oxygenase Inducers as Treatment for Nonalcoholic Fatty Liver Disease**. International Journal of Molecular Sciences, 2020. Vol 21(24). doi:10.3390/ijms21249493.

SILVA, WALISSON J. M.; FERRARI, CARLOS K. B. **Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento**. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol., Rio de Janeiro, 2011; 14(3):441-451.

STURZA A, POPOIU CM, IONICĂ M, DUICU OM, OLARIU S, MUNTEAN DM, BOIA ES. **Estresse Oxidativo Vascular Relacionado à Monoamina Oxidase em Doenças Associadas à Carga Inflamatória**. Oxid Med Cell Longev. 15 de abril de 2019; 2019: 8954201. doi: 10.1155 / 2019/8954201. PMID: 31178977; PMCID: PMC6501417.

TATE M, HIGGINS GC, DE BLASIO MJ, LINDBLOM R, PRAKOSO D, DEO M, KIRIAZIS H, PARK M, BAEZA-GARZA CD, CALDWELL ST, HARTLEY RC, KRIEG T, MURPHY MP, COUGHLAN MT, RITCHIE RH. **The Mitochondria-Targeted Methylglyoxal Sequestering Compound, MitoGamide, Is Cardioprotective in the Diabetic Heart**. Cardiovasc Drugs Ther. 2019 Dec;33(6):669-674. doi: 10.1007/s10557-019-06914-9. Erratum in: Cardiovasc Drugs Ther. 2020 Feb 15;; PMID: 31654171; PMCID: PMC6994445.

TITORENKO VI, TERLECKY SR. **Peroxisome metabolism and cellular aging**. Traffic. 2011 Mar;12(3):252-9. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01144.x. Epub 2010 Dec 6. PMID: 21083858; PMCID: PMC3077116.

TORIUMI K, MIYASHITA M, SUZUKI K, TABATA K, HORIUCHI Y, ISHIDA H, ITOKAWA M, ARAI M. **Role of glyoxalase 1 in methylglyoxal detoxification-the broad player of psychiatric disorders**. Redox Biol. 2022 Feb;49:102222. doi: 10.1016/j.redox.2021.102222. Epub 2021 Dec 22. PMID: 34953453; PMCID: PMC8718652.

THORNALLEY PJ. **Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation**. Biochem Soc Trans. 2003 Dec;31(Pt 6):1343-8. doi: 10.1042/bst0311343. PMID: 14641060.

TRACHOOTHAM D, LU W, OGASAWARA MA, NILSA RD, HUANG P. **Redox regulation of cell survival**. Antioxid Redox Signal. 2008;10(8):1343-1374. doi:10.1089/ars.2007

THORNALLEY PJ. **Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation**. Biochem Soc Trans. 2003 Dec;31(Pt 6):1343-8. doi: 10.1042/bst0311343. PMID: 14641060.

ULLAH I, ZHAO L, HAI Y, FAHIM M, ALWAYLI D, WANG X, LI H. **Metal elements and pesticides as risk factors for Parkinson's disease - A review**. Toxicol Rep. 2021 Mar 10;8:607-616. doi: 10.1016/j.toxrep.2021.03.009. PMID: 33816123; PMCID: PMC8010213.

VALKO, M; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MANZUR, M. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer**. Chemico-Biological Interactions, Volume 160, Issue 1, 2006, Pages 1-40.

VASCONCELOS, SANDRA M. L.; GOULART, MARÍLIA O. F.; MOURA, JOSÉ B. F.; MANFREDINI, VANUSA; BENFATO, MARA S.; KUBOTA, LAURO T. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação.** Química Nova [online]. 2007, v. 30, n. 5 [Acessado 16 Agosto 2021], pp. 1323-1338.

VOET, DONALD; VOET, JUDITH G.; PRATT, CHARLOTTE W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014

van ZANDWIJK N. **N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH):** antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. J Cell Biochem Suppl. 1995;22:24-32. doi: 10.1002/jcb.240590805. PMID: 8538205.

WANG, H-Q; SUN, X-B; XU Y-X; ZHAO H; ZHU Q-Z; ZHU C-Q. **Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells.** Brain Research, 2010, Vol 1360(none), 159–167. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.10.

WAZA AA, HAMID Z, ALI S, BHAT SA, BHAT MA. **A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil.** Inflamm Res. 2018 Jul;67(7):579-588. doi: 10.1007/s00011-018-1151-x. Epub 2018 Apr 24. PMID: 29693710.

YAN T, ZHAO Y, ZHANG X, LIN X. **Astaxanthin Inhibits Acetaldehyde-Induced Cytotoxicity in SH-SY5Y Cells by Modulating Akt/CREB and p38MAPK/ERK Signaling Pathways.** Mar Drugs. 2016 Mar 10;14(3):56. doi: 10.3390/md14030056. PMID: 26978376; PMCID: PMC4820310.

YANG D; ELNER, S G; BIAN Z; TILL G O; PETTY H. R; ELNER, V M. **Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells.** Exp Eye Res. 2007, vol 85(4). doi:10.1016/j.exer.2007.06.013.

ZHANG X, WANG X, GAO L, YANG B, WANG Y, NIU K, LAI J, WAN S, LUO J. **TNF- α Induces Methylglyoxal Accumulation in Lumbar Herniated Disc of Patients With Radicular Pain.** Front Behav Neurosci. 2021 Nov 23;15:760547. doi: 10.3389/fnbeh.2021.760547. PMID: 34887734; PMCID: PMC8651280.