

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEC
Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Modulação da viabilidade celular em relação ao estresse oxidativo pelo pré-tratamento com a alga *Gigartina skottsbergii*

Rafaela Gomes Xavier

Pelotas, 2015

Rafaela Gomes Xavier

Modulação da viabilidade celular em relação ao estresse oxidativo pelo pré-tratamento com a alga *Gigartina skottsbergii*

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dra. Fernanda Nedel

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

X1m

Xavier, Rafaela Gomes

Modulação da viabilidade celular em relação ao estresse oxidativo pelo pré - tratamento com a alga *Gigartina skottsbergii*. / Rafaela Gomes Xavier. – 50f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientadora Fernanda Nedel.

1.Biotecnologia. 2.*Gigartina skottsbergii*. 3.Viabilidade celular. 4.Terapia celular. 5.Ácido graxo ômega 3. I.Nedel, Fernanda. II.Título.

CDD:613.2843

Rafaela Gomes Xavier

Modulação da viabilidade celular em relação ao estresse oxidativo pelo pré -
tratamento com a alga *Gigartina skottsbergii*.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 04/12/2015

Banca examinadora:

Prof. Dra. Fernanda Nedel (Orientadora)
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Rachel Krolow da Silva Bast
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Eliana do Nascimento Torre
Doutora em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho aos meus pais, meus dois
irmãos e aos meus queridos amigos.**

Agradecimentos

A minha orientadora Prof. Dr. Fernanda Nedel, pela oportunidade e todo o suporte na elaboração deste trabalho, pela orientação, sensibilidade, amizade, carinho e confiança depositada.

A Camila Perelló Ferrúa por toda a paciência, disponibilidade, compreensão, pelos conhecimentos repassados e pela amizade que se construiu para além dos espaços da universidade.

Aos meus pais Rita e Darci e aos meus irmãos Gabriel e Caetano, agradeço por serem a base de tudo, de todos meus princípios, minha índole e meus valores. E agradeço principalmente por todo o amor incondicional.

As minhas irmãs do coração, Julie Anne e Marília, e as minhas colegas Luíza, Micaela e Roberta por todos às vezes que já ouviram falar deste trabalho, por todas as noites estudando, por serem sempre minhas amigas, companheiras e por todo o apoio.

E anche a te Gianluca, grazie mille per aver lasciato tutto, per cambiare di continente solo per stare vicino. Per tutto l'amore, sostegno ed affetto.

Aos professores do curso de Biotecnologia e a Universidade Federal de Pelotas por todo conhecimento adquirido.

Muito obrigado!

Resumo

XAVIER, Rafaela Gomes. **Modulação da viabilidade celular em relação ao estresse oxidativo pelo pré-tratamento com a alga *Gigartina skottsbergii*** 2015. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A terapia celular apresenta-se como uma estratégia promissora no tratamento de diversas lesões, indicando a possibilidade de reconstituição de um tecido danificado, assim como o restauro da sua atividade fisiológica. O ambiente inflamatório de uma lesão é composto por altas taxas de radicais livres, os quais são controlados por mecanismos antioxidantes. A fração lipídica da alga vermelha rodófitica *Gigartina skottsbergii* é caracterizada por apresentar ácidos graxos ômega-3 (ω -3), lipídeos com propriedades modulatórias de caráter anti-inflamatório e antioxidante. Em função do potencial antioxidante da *G. skottsbergii* e devido a recorrente busca por métodos capazes de reverter eficientemente o estresse oxidativo, esse estudo teve por objetivo avaliar a capacidade da alga *G. skottsbergii* em promover a manutenção ou melhoria da viabilidade das células NIH/3T3 após a exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para tanto as células NIH/3T3 foram pré-tratadas por 2 e 6 horas com a fração lipídica da alga nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, e posteriormente expostas ao H_2O_2 nas concentrações de 50, 100 e 500 μM por 6 e 12 horas. A viabilidade celular foi estabelecida pelo ensaio colorimétrico MTT e os dados analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados demonstram que as células NIH/3T3 foram sensíveis ao H_2O_2 na concentração de 100 μM em um tempo de exposição de 12 horas, onde a fração lipídica da alga mostrou-se capaz de induzir o aumento da viabilidade celular quando as células NIH/3T3 foram pré-tratadas com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 6 horas ($P = 0,006$). O efeito modulatório de caráter antioxidante é possivelmente um reflexo das propriedades do ω -3 presentes na fração lipídica da alga. Neste sentido este trabalho permite vislumbrar a possibilidade de um tratamento prévio das células com a fração lipídica desta alga antes da sua aplicação em terapias celulares que envolvam a implantação em locais com altos níveis de estresse oxidativo, como em lesões teciduais.

Palavras-chave: terapia celular; *Gigartina skottsbergii*; ácido graxo ômega-3; antioxidante; viabilidade celular

Abstract

XAVIER, Rafaela Gomes. **Modulação da viabilidade celular em relação ao estresse oxidativo pelo pré-tratamento com a alga *Gigartina skottsbergii***. 2015. 50f. Final Project (Biotechnology Undergraduate Program) - Bachelor of Biotechnology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

Cell therapy is a promising strategy for treatment of different lesions, indicating the possibility to reconstitute a damaged tissue, as well as to restore its physiological activity. The inflammatory environment of lesions has high concentrations of free radicals, which are controlled by antioxidant mechanisms. The lipid fraction of the red *Rhodophyta Gigartina skottsbergii* seaweed is characterized by presenting omega-3 fatty acids (ω -3), which are lipids with anti-inflammatory and antioxidant modulatory properties. Due to the antioxidant potential of *G. skottsbergii* and the recurring research for methods to effectively reverse oxidative stress, this study aimed to evaluate the potential of *G. skottsbergii* seaweed to maintain or improve NIH/3T3 viability after exposure to hydrogen peroxide (H_2O_2). In this sense NIH/3T3 cells were pre-treated for 2 and 6 hours with 1, 10, 50 and 100 μ g/mL of seaweed lipid fraction, and subsequently exposed to 10, 100 and 500 μ M of H_2O_2 for 6 and 12 hours. Cell viability was established by the MTT colorimetric assay and analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test ($P < 0.05$). Results demonstrate that NIH/3T3 cells were sensitive to 100 μ M of H_2O_2 in 12 hours of exposure, where the seaweed lipid fraction was able to induce the increase in cell viability when NIH/3T3 cells were pre-treated with 50 and 100 μ g/mL for 6 hours ($P = 0.006$). The antioxidant modulatory effect is possibly a reflection of ω -3 properties, present in the seaweed lipid fraction. In this sense, this study highlights the possibility of cell pre-treatment with this seaweed prior to implantation in areas with high levels of oxidative stress, such as tissue lesion, for cell therapy approaches.

Key-words: cell therapy; *Gigartina skottsbergii*; Omega-3 fatty acids; antioxidant; cell viability

Lista de Figuras

Figura 1	Fotografia da alga <i>Gigartina skottsbergii</i> em meio ao seu habitat.	18
Figura 2	Fotografia da alga <i>Gigartina skottsbergii</i> em meio ao seu habitat.	19
Figura 3	Composição de ácidos graxos de rodofíceas.	19
Figura 4	Esquema da rota de acumulação de ácidos graxos.	20
Figura 5	Evento de redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂).	21
Figura 6	Estrutura ácidos eicosapentanoico e docosaheptaenoico.	26
Figura 7	Gráfico do protocolo experimental 1.	33
Figura 8	Gráfico protocolo experimental 2 com 50 uM de H ₂ O ₂ por 6 h.	34
Figura 9	Gráfico protocolo experimental 2 com 50 uM de H ₂ O ₂ por 12h.	35
Figura 10	Gráfico protocolo experimental com 100 uM H ₂ O ₂ por 6 h.	36
Figura 11	Gráfico protocolo experimental com 100 uM H ₂ O ₂ por 12 h.	36
Figura 12	Gráfico protocolo experimental com 500 uM H ₂ O ₂ por 6 h.	37
Figura 13	Gráfico protocolo experimental com 500 uM H ₂ O ₂ por 12 h.	37

Lista de Abreviaturas e Siglas

Mm	Micrômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
RPM	Rotação por minuto
°C	Graus Celsius
S	Segundo
G	Gramma
H	Hora
Min	Minuto
>	Maior
<	Menor
°	Graus
ml	Mililitro
cm ²	Centímetros quadrados
%	Percentual
US\$	Dólares
ω-3	Ômega-3
ω-6	Ômega-6
AA	Ácido araquidônico
EPA	Eicosapentaenóico
DHA	Docosahexaenóico
G. skottsbergii	Gigartina skottsbergii
SOD	Superóxido dismutase
GPX	Glutationa peroxidase
CAT	Catalase
MUFA	Monounsaturated fatty acids
PUFA	Poly Insaturated Fatty Acids
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
SPI	Espécies reativas de lipídeos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
ONOO	Peroxinitrito
O ₃	Ozônio
O ₂	Oxigênio
OH	Hidroxila
RO	Alcoxila
ROO	Peroxila

ATP	Trifosfato de adenosina
Mn	Manganês
Cu	Cobre
Zn	Zinco
UV	Ultravioleta
IPSCs	Células somáticas pluripotentes induzidas
Nrf-2	Fator nuclear eritróide 2
COX-1	Ciclo oxigenase 1
COX-2	Ciclo oxigenase 2
NFKB	Fator nuclear kappa beta
SIRT-1	Sirtuina 1
HO-1	Heme oxigenase 1
KEAP1	Kelch like-ECH-associated protein 1
HMC-1	Human leukaemic mast cell
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Algas	15
2.1.1 Algas vermelhas	16
2.1.2 Conteúdo lipídico das algas	16
2.1.3 <i>Gigartina skottsbergii</i>	18
2.1.4 <i>Gigartina skottsbergii</i> - conteúdo lipídico	19
2.2 Espécies reativas	20
2.2.1 Peroxidação lipídica	22
2.2.2 Radicais livres e lesões	22
2.2.3 Antioxidantes	23
2.2.4 Algas marinhas e estresse oxidativo	24
2.3 Ácidos graxos ômega-3	25
2.4 Terapia celular	27
3. OBJETIVO	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Delineamento experimental	30
4.1.1 Obtenção da fração lipídica da alga <i>G. skottsbergii</i>	30
4.1.2 Linhagem celular e cultivo celular	30
4.2 Protocolo experimental 1 - Ensaio de viabilidade celular da fração lipídica da alga <i>Gigartina skottsbergii</i>	31
4.3 Protocolo experimental 2 - Avaliação da viabilidade celular mediante o pré-tratamento com <i>Gigartina skottsbergii</i> e insulto com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	32
4.3.1 Insulto com peróxido de hidrogênio	32
4.4 Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33
5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 - Viabilidade celular da fração lipídica da alga <i>Gigartina skottsbergii</i>	33
5.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 - Viabilidade celular mediante o pré-tratamento com <i>G. skottsbergii</i> e insulto com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	33
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

Algas são organismos fotossintetizantes expostos a intensas quantidades de luz e oxigênio como meio de produção energética, tornando-as altamente suscetíveis a ação de radicais livres (ROCHA et al., 2007). Dentre as classificações, o filo das rodofíceas apresenta-se com o maior número de espécies de algas marinhas (STENGEL et al., 2011). As rodofíceas apresentam a coloração avermelhada, devido ao verde da clorofila ser encoberta pelo pigmento acessório, localizado no interior do cloroplasto, a ficoeritrina (RAVEN et al., 2005). A alga *Gigartina skottsbergii* é uma alga rodofícea, endemicamente localizada na região sul do continente sul americano, estendendo-se até a sua extremidade (RAMIREZ e SANTELICES, 1991). A *G. skottsbergii* representa para essa região uma grande importância ecológica, social e econômica (MANSILLA et al., 2012). A extração de carragenina, a sua porção polissacarídica, utilizada na indústria para espessar compostos é o seu principal mercado. Porém, não somente a fração polissacarídica tem se mostrado interessante, uma vez que a fração lipídica da alga contém diversos ácidos graxos com propriedades relevantes. O extrato lipídico apresenta ácidos graxos poli-insaturados como os da família ômega-6 e ômega-3 (GRAEVE et al., 2002). Atualmente, o ômega-3 é uma classe de compostos diretamente associados aos seus efeitos benéficos de cunho anti-inflamatório e antioxidante, sendo o ácido eicosapentanoico (EPA) e o ácido docosa-hexaenoico (DHA) os seus dois representantes (RICHARD et al., 2008). Diversos estudos relatam e sugerem os mecanismos capazes de proporcionar as duas condições (anti-inflamatória e antioxidante). Segundo Wang (2010) e Palaniswamy (2014) a associação do perfil antioxidante principalmente da modulação enzimática proporcionada pela interação de EPA e DHA com as células, proporciona um aumento de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT), assim como a ativação e regulação de genes e vias de sinalização.

As propriedades antioxidantes de EPA apresentam-se como recurso à manutenção da homeostasia e combate aos danos causados pelo desbalanceamento dos sistemas oxidante e antioxidante, configurando um ambiente

de estresse oxidativo. A terapia celular apresenta-se como um promissor método de tratamento para uma vasta quantidade de doenças (LARIJANI et al., 2012). Nesta terapia ocorre a inserção de células específicas ou de células indiferenciadas, como as células tronco, normalmente em um ambiente com altos níveis de estresse oxidativo como em lesões teciduais severas, sendo exemplos lesões cardiovasculares e medulares. A pré-incubação da porção lipídica de *G. skottsbergii* com as células que serão destinadas a terapia celular, pode ser uma alternativa de potencialização da implementação destas no ambiente lesado, uma vez que este ambiente em relação à inserção torna-se adverso à incorporação efetiva das células implantadas, dificultando a sua posterior adesão, proliferação e liberação de substâncias tróficas, para que assim seja efetiva ao objetivo de diminuição da lesão ou mesmo de reparo (CAPLAN e DENNIS, 2006; VALLE-PRIETO e CONGET, 2010).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Algas

A hidrosfera terrestre, predominantemente representada pelos oceanos, estende-se ocupando uma grande área ao longo do planeta, constituindo ao longo das últimas décadas um significativo recurso para a identificação e exploração de novas substâncias com potenciais terapêuticos. A particularidade dos ecossistemas marinhos estabelece uma diversidade de condições para a formação de múltiplos biocompostos (GAMMONE et al., 2015).

Os diferentes mecanismos de sobrevivência e adaptação das algas aos múltiplos perfis de nichos biológicos estende-se ao longo de 2,45 bilhões de anos (RASMUSSEN et al., 2008), havendo como consequência paralela a esse processo a co-evolução de uma série de compostos bioquímicos. A determinação das propriedades dos produtos bioquímicos decorrentes da evolução, não estão ainda plenamente elucidados no que diz respeito ao âmbito de suas funções biológicas, em virtude da grande diversidade ecológica existente e a variabilidade química associada (STENGEL et al., 2011).

As algas apesar de apresentarem funções ecológicas e biológicas similares às plantas, dispõem de uma diversidade bioquímica tanto quanto significativa quando comparadas. Dentre as algas, as múltiplas circunstâncias que as contornam, na conjuntura de localização, sazonalidade e forma de crescimento, por exemplo, resultam na elaboração de diferentes níveis e tipos de compostos bioativos diante aos estímulos recebidos (STENGEL et al., 2011). As propriedades de pigmentos naturais, minerais essenciais, vitaminas, lipídios, enzimas e polissacarídeos das algas marinhas são considerados como compostos promissores (MOHAMED et al., 2012), e por conseguinte focos de interesse das suas competências e aplicabilidade.

Desta maneira, o que se observa é uma crescente averiguação do potencial valor comercial à diversidade de produtos biológicos sintetizados por micro e macroalgas, verificando-se uma expansão recente a nível de publicações científicas alusivas a estes organismos, essencialmente no contexto farmacêutico e terapêutico, bioenergético e alimentício (SMIT, 2004; DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2011; PLAZA et al., 2009). Na área da saúde a sua aplicação é visada em

decorrência de propriedades antivirais, antialérgicas, anticancerígenas, anti-obesidade, anti-inflamatória, anticoagulante, antioxidante entre outras (TSAI e PAN, 2012).

2.1.1 Algas vermelhas

Do ponto de vista quantitativo, o grupo de espécies macrófitas marinhas mais numeroso, pertence às algas vermelhas, com mais de 6000 espécies descritas (COLLÉN et al., 2013). Estas demonstram excepcionais aspectos estruturais, como a presença de tilacóides desempilhados, desprovimento de centríolos e flagelos e a presença de receptores constituídos de ficobiliproteínas (COLLÉN et al., 2013). A estrutura de parede celular é composta de um complexo formado por celulose, galactanas sulfatadas (carrageninas e ágar) além de várias hemiceluloses (POPPER et al., 2011). Ecologicamente, são elementos importantes em diversos ecossistemas de domínio pelágico, distribuindo-se também entre recifes de corais, em água doce e costas rochosas (COLE e SHEATH, 1990). A reserva energética polissacarídica é o amido, disposto em forma de grânulos no citoplasma (amido das florídeas) (COLE E SHEATH, 1990). Um mercado significativo economicamente de algas vermelhas foi implementado principalmente pela sua porção de conteúdo polissacarídeo. Utilizando como exemplo a carragenina, que por sua aplicabilidade na texturização de alimentos gerou um ganho no ano de 2010 superior a US\$ 500 milhões (BIXLER e PORSE, 2011), assim como o lucrativo segmento de mercado com vendas diretamente para o consumo humano que geram em torno de aproximadamente US\$1,300 milhões ao ano (BLOUIN et al., 2011).

2.1.2 Conteúdo lipídico das algas

O conteúdo lipídico exibido pelas algas, no momento atual, vem sendo explorado como uma fonte principal a distintos tipos de atividades, contemplando áreas como a produção de combustíveis renováveis como o biodiesel (GRIFFITHS e HARRISON, 2009) até a confecção de produtos cosméticos de beleza (PULZ e Gross, 2004). No entanto, o entendimento do metabolismo lipídico nesses organismos e as potenciais aplicações influenciadas por este processo ainda estão sendo estabelecidos. A disposição da fração lipídica nas algas é dividida em ácidos graxos do tipo monoinsaturados e poliinsaturados, que em inglês são denominados

respectivamente “*monounsaturated fatty acids*” (MUFA) e “*Poly Insaturated Fatty Acids*” (PUFA). Em relação a PUFA, a sua arquitetura de cadeias carbônicas são constituídas por um número superior a 18 carbonos, estando incluídos ácidos graxos do tipo ômega-3 (ω -3) como o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ômega-6 (ω -6) como o ácido araquidônico (AA) (CALDER, 2001).

A pluralidade do conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas algas, sugere a abundância de aplicabilidades que podem ser elaboradas. A literatura relata potenciais propriedades terapêuticas, como por exemplo, para o EPA no contexto de exercer ação contra patologias, como a artrite reumatoide e doenças neurodegenerativas, promovidos pela sua capacidade e desempenho anti-inflamatório e imunomodulatório (LORENTE-CEBRIÁN et al., 2015), e também por apresentar uma atividade de caráter antioxidante (PALANISWAMY et al., 2014). Além do EPA (ácido eicosapentaenoico), também o DHA (ácido docosahexaenóico) outro ácido graxo pertencente à família ômega-3, previne diversas patologias, como por exemplo, as envolvidas com o sistema cardíaco (HOLUB, 2009) e neurodegenerativas.

A classe de glicoglicerolípídeos, onde uma unidade de glicerol está ligado glicosidicamente em resíduos de açúcar de proteínas de membranas, também apresentam propriedades interessantes. A partir de um estudo feito por Al-Fadhli (2006), analisando a alga vermelha *Chondria armata* e a sua porção de galactoglicerolípídeos, obteve-se como resultados que estes elementos são dotados de uma capacidade de controle e de ação antimicrobiana.

A quantidade e composição da fração lipídica em algas depende da sua essência taxonômica, da dinâmica de esfera de crescimento, do seu ponto de localização e o período da estação do ano (STENGEL et al., 2011). Em um estudo feito por Kumari (2010), algas vermelhas apresentaram a menor variabilidade de conteúdo lipídico quando comparadas com algas marrons e verdes. A nível de temperatura, espécies de algas encontradas em ambientes mais frios apresentam conteúdos de PUFA mais elevado em comparação a representantes de habitats mais quentes, os quais detém mais ácidos graxos monoinsaturados (KUMARI et al., 2010).

2.1.3 *Gigartina skottsbergii*

A *Gigartina skottsbergii* é uma alga rodófitica, conhecida comumente por “cuero de chancho” ou “roja luga” (MANSILLA et al., 2012), estabelecida em um ambiente protegido do tipo subtidal, presente endemicamente na região sul do continente latino americano (RAMÍREZ e SANTELICES, 1991). Encontrada pela costa da Argentina, da província de Chubut estendendo-se em direção as ilhas subantárticas (PIRIZ, 1996). Na costa chilena estão presentes em Corral (39 ° 88 'S) (RAMÍREZ e SANTELICES, 1991), uma pequena cidade no sul do país localizada na província de Valdivia, até a Península Antártica (63 ° 23'S) (BISCHOFF-BASMANN e WIENCKE, 1996). A principal região de produção de biomassa proveniente da *G. skottsbergii* é a localidade de Magalhães, no Chile, com uma produção em torno de vinte mil toneladas da alga seca (MANSILLA et al., 2012).

A alga *G. skottsbergii* dispõem-se horizontalmente sobre os substratos por estruturas basais especializadas de ancoragem, que proporcionam o crescimento e fixação à superfícies de pedras, rochas e conchas bivalves (MANSILLA et al., 2012). Na porção da sua fronda assume variados tamanhos e organiza-se na forma orbicular podendo chegar a uma largura de 1,5 metros. Dependendo da localização geográfica são capazes de desenvolver-se em profundidades que variam de 4 a 30 metros. A sua disposição de crescimento tende a diminuir a disponibilidade de substratos, desfavorecendo o desenvolvimento de outras espécies. Apresentam-se em estruturas grossas, com um ciclo de vida isomorfo, com uma coloração vermelha-púrpura (MANSILLA et al., 2012).



Figura 1 - Fotografia da alga *Gigartina skottsbergii* em meio ao seu habitat. Fonte: © Dirk Schories



Figura 2 - Fotografia da alga *Gigartina skottsbergii* em meio ao seu habitat. Fonte: © Departamento de ciências e recursos naturais, Faculdade de Ciências, Universidade de Magalhães, Punta Arenas, Chile.

2.1.4 *Gigartina skottsbergii* - conteúdo lipídico

Avaliando as características de ácidos graxos específicos em macroalgas da Antártida e da região Ártica, Graeve (2002) identificou pela primeira vez diferentes taxas de lipídios em diversas espécies, conforme visto na figura 3. Este trabalho foi realizado afim de obter dados em relação as composições lipídicas e as relações filogenéticas existentes, assim como o aspecto quantitativo para posterior utilização como potenciais agentes terapêuticos. A análise da ordem *gigartinales* representada pela *G. skottsbergii* proveniente da Antártida indica as diferentes famílias lipídicas que as constituem. A *G. skottsbergii* apresenta uma quantidade de 28,4% de ácido palmítico (16:0), 22,2% de ácido araquidônico (AA) (20:4 (n-6)) e 25,2% de ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:5 (n-3)). As significativas quantidades de AA e EPA coincidem com as principais vias de acumulação de ácidos graxos poli-insaturados conforme os dados apresentados na figura 4.

Fatty acids	Palmariales			Gigartinales		Acrochaetiales	Rhodymeniales	
	<i>Devaleraea ramentacea</i> (Arc)	<i>Palmaria palmata</i> (Arc)	<i>Palmaria decipiens</i> (Ant)	<i>Gymnogongrus turquetii</i> (Ant)	<i>Gigartina skottsbergii</i> (Ant)	<i>Audouinella purpurea</i> (Ant)	<i>Rhodymenia subantarctica</i> (Ant)	<i>Hymenocladia opsis crustigena</i> (Ant)
14:0	9.8	5.7	9.4	1.9	2.2	1.5	7.5	3.5
15:0	0.6	-	0.5	0.2	0.4	-	-	0.5
16:0	25.5	19.4	20.9	29.4	28.4	23.6	20.5	30.4
16:1(n-7)	9.0	0.3	2.8	3.1	5.5	0.9	32.7	4.4
16:1(n-5)	-	-	-	-	-	-	-	0.3
16:2(n-4)	0.4	-	-	-	0.4	-	1.8	0.6
16:3(n-4)	-	-	-	0.1	0.5	-	-	0.5
16:4(n-1)	0.4	-	-	-	0.5	-	0.7	1.4
18:0	3.1	0.4	0.9	0.5	0.8	-	1.6	0.6
18:1(n-9)	7.5	2.1	7.0	3.3	10.7	2.0	12.5	3.9
18:1(n-7)	3.1	3.2	4.8	1.5	2.5	1.6	4.8	1.7
18:2(n-6)	3.4	0.5	0.4	3.6	0.7	0.6	0.9	3.4
18:3(n-3)	4.1	-	0.2	-	-	-	1.1	0.8
18:4(n-3)	6.7	-	0.4	-	-	-	4.1	1.8
20:4(n-6)	1.9	1.1	2.2	11.5	22.2	9.4	1.0	8.5
20:4(n-3)	0.6	-	-	-	-	-	-	-
20:5(n-3)	24.2	67.3	49.8	44.3	25.2	60.3	10.8	37.3
22:6(n-3)	1.6	-	0.7	0.5	-	-	-	0.5
SAFA	35.9	25.1	30.7	31.5	31.0	25.1	28.0	34.3
NUFA	19.5	5.6	14.7	8.0	18.7	4.5	50.0	10.3
PUFA	43.3	68.9	53.7	60.0	49.4	70.4	20.4	54.8
(n-6) FA	5.3	1.6	2.6	15.1	22.9	10.1	1.9	11.9
(n-3) FA	37.2	67.3	51.1	44.8	25.2	60.3	15.9	40.3
(n-3)/(n-6)	7.0	42.2	19.9	3.0	1.1	6.0	8.3	3.4

Figura 3 - Composição de ácidos graxos de rodófitas. Em (massa %) da porção ártica (Arc) e Antártica (Art) do planeta. Fonte: GRAEVE et al., 2002.

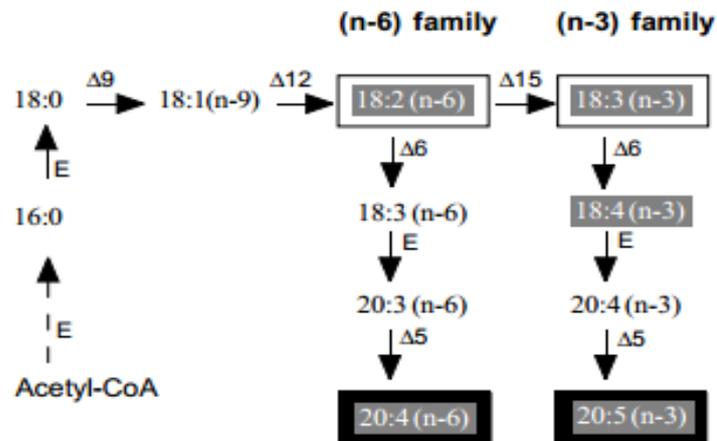


Figura 4 - Esquema da rota de acumulação de ácidos graxos. FONTE: GRAEVE et al., 2002.

2.2 Espécies reativas

A mais de um século, pela primeira vez, os radicais livres foram descritos por Moses Gomberg (GOMBERG, 1900). Porém, somente na década de cinquenta foi proposto que os radicais livres poderiam estar em associação com os sistemas biológicos (COMMONER et al., 1954), sendo atualmente correlacionados como componentes de diversas patologias (GERSCHMAN et al., 2005) e de processos de envelhecimento (HARMAN, 2009). As espécies reativas proporcionam a geração de radicais livres, como as espécies reativas de nitrogênio (RNS) (NO, NO₂ e ONOO), espécies reativas de lipídeos (SPL) e de oxigênio (ROS) (O₂⁻, OH, H₂O₂, RO, RO₂, O₂ e O₃) entre outras, as quais estão relacionadas à processos de sobrevivência, proliferação, envelhecimento, senescência e morte celular (KAMINSKY e ZHIVOTOVSKY, 2014). Em organismos sob condições aeróbicas, conforme a figura 5, o O₂ molecular sofre redução tetravalente até a formação de H₂O (LUSHCHAK, 2014), no entanto produtos como os superóxidos, os peróxidos de hidrogênio e as hidroxilas também são produzidos, por intermédio da cadeia transportadora de elétrons localizada internamente na membrana mitocondrial (KAMINSKY e ZHIVOTOVSKY, 2014). O processo executado na cadeia transportadora de elétrons é acoplado a fosforilação oxidativa, visando a produção de energia em forma de trifosfato de adenosina (ATP). A configuração eletrônica do oxigênio apresenta uma forte tendência ao recebimento de um elétron por vez, proporcionando a formação

de intermediários altamente reativos (BABIOR, 1997). O oxigênio molecular passa a ser reduzido, resultando na formação do ânion superóxido O_2^- . Sofrendo em seguida a redução por um elétron com concomitante aceitação de dois prótons, formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ganhando mais um elétron forma o radical hidroxila (OH), finalmente OH interage com um outro elétron resultando na conformação de dois prótons da molécula de água (H_2O) (LUSHCHAK, 2014). Diante deste processo, as ROS são definidas como subprodutos fisiológicos que acabam por criar espécies altamente reativas (BABIOR, 1997).

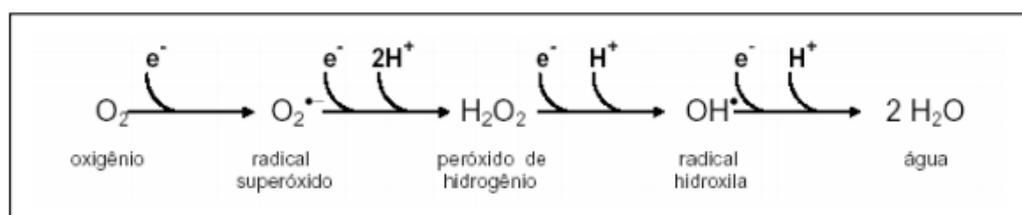


Figura 5 – Evento de redução tetraeletrônica do oxigênio molecular (O_2). Formação de água, ocorrido no interior da mitocôndria. Fonte: Adaptado de AMES et al., 1993.

Do oxigênio inalado por seres humanos, 95% é transferido e consumido pelas mitocôndrias, o restante é utilizado por enzimas oxidases e oxigenases, havendo um percentual de 2% a 5% de oxigênio que é reduzido de forma univalente, promovendo a formação de radicais livres (MAZZA et al., 2007; BARBOSA et al., 2010). A dinâmica de produção de radicais livres é estabelecida a fim de haver o cumprimento das atividades biológicas necessárias, sendo dessa maneira executado fisiologicamente de forma contínua (BARBOSA et al., 2010). O excesso de radicais livres ou o desequilíbrio entre a produção destes com a ineficiência da sua remoção, configura uma situação de estresse oxidativo. Várias evidências sugerem que a oxidação das biomoléculas desencadeadas pelo estresse oxidativo, desempenham um papel chave em diversas doenças (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999) como na aterosclerose (BANKSON et al., 1993), no diabetes (JOHANSEN et al., 2005), em processos infecciosos, no câncer (KHANNA et al., 2014), na insuficiência cardíaca (TANIYAMA e GRIENDLIN, 2003), em patologias neurodegenerativas como Alzheimer (DI DOMENICO et al., 2014), Huntington (BORLONGAN et al., 1996) e Parkinson (HALLIWELL, 2001), pelo potencial dano causado em células e tecidos.

A consequência da alta reatividade das ROS é a possibilidade de promover lesões oxidativas ocasionadas pela suas interações com diversos complexos enzimáticos, membranas, conteúdo lipídico, e demais componentes da arquitetura celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1987). Desencadeando, assim, processos como a peroxidação lipídica que pela agressão gerada a ácidos graxos principalmente das membranas, comprometem as células como um todo, culminando drasticamente com a morte celular (ROSS e GLEN, 2014). As funções mitocondriais também podem ser prejudicadas, pela interferência na quantidade de ATP produzido, subsequentemente facilitando a morte celular por necrose (ORRENIUS et al., 2007), da mesma forma que enzimas liberadas pelas lesões, como o citocromo c, por exemplo, podem passar a ativar vias de apoptose celular (KAMINSKY e ZHIVOTOVSKY, 2014). O estresse oxidativo é combatido por antioxidantes que podem ser absorvidos pela dieta ou produzidos pelo organismo, representados por um ampla classe de compostos (HUANG et al., 2005).

2.2.1 Peroxidação lipídica

Peroxidação lipídica, são reações envolvendo predominantemente as ROS que reagem com os ácidos graxos do tipo poli-insaturados (ROSS et al., 2014), produzindo o radical peroxila capaz de reagir com outros ácidos graxos adjacentes a região ou se reduzir formando o hidroperóxido de lipídio, composto suficientemente estável para ser facilmente assimilado por vários tecidos incluindo o sangue (GUTTERIDGE, 1995). A nível celular a progressão desse tipo de reação e os produtos gerados podem interferir na maior permeabilidade da bicamada lipídica da membrana, ocasionada pela interferência dos radicais em canais iônicos e proteínas de transporte (KEHRER e KLOTZ, 2015). O grau de oxidação para ácidos graxos é proporcional ao grau de instauração apresentado, promovido pela susceptibilidade das ligações duplas favorecida pela baixa energia de dissociação homolítica (KEHRER e KLOTZ, 2015), sendo assim o ácido palmítico o menos oxidável e o DHA o mais suscetível (RICHARD et al., 2008).

2.2.2 Radicais livres e lesões

Os radicais de oxigênio não são gerados somente no ambiente mitocondrial, mesmo sob condições metabólicas normais. Em situações de ataque ou injúria,

células do sistema imune, como os macrófagos e os neutrófilos, produzem ROS por intermédio de uma ligação com a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na sua forma reduzida *de* (NADPH)-oxidase, com a finalidade de promover morte celular e atividades bactericidas (KHANNA et al., 2014). A NADPH-oxidase é encontrada também em linhagens de células humanas tumorais onde liberam radicais (HALLIWELL e CROSS, 1994).

Em uma situação metabólica equilibrada a eliminação de ROS é controlada por um sistema antioxidante onde, nos mamíferos, este sistema é composto essencialmente por duas vias, a enzimática e a não enzimática. Como já mencionado, o desequilíbrio entre a geração de ROS e a sua eliminação resulta no estresse oxidativo (KHANNA et al., 2014). Processos inflamatórios tem como finalidade proteger o local da injúria, porém a atividade de defesa do sistema imune realizado por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e diversas citocinas pró-inflamatórias entre outros induzem ambientes de estresse oxidativo e diminuição de atividades antioxidantes (RAMOS et al., 2000). Diante de situações de inflamações crônicas relata-se, como um conceito geral, ser esta a causa da ativação de muitos mecanismos de envelhecimento precoce e promoção de diversos tipos de canceres (KHANNA et al., 2014).

2.2.3 Antioxidantes

Evolutivamente os organismos aeróbios multicelulares passaram a fazer adaptações cada vez mais complexas para assegurar a utilização do oxigênio à promoção de energia em todas as células que necessitam. Paralelamente, ocorreram evoluções também na defesa antioxidante para prevenir e combater os efeitos tóxicos provocados pelo oxigênio (ARUOMA, 1998).

Em humanos a defesa antioxidante é complexa, incluindo moléculas provenientes da ingestão pela dieta e moléculas endógenas como enzimas. A defesa endógena do tipo enzimática é composta por glutathione peroxidase (GPx), dismutase (SOD) e catalase (CAT). A enzima SOD catalisa a dismutação de superóxido (O_2^-) convertendo-o em peróxido de hidrogênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Existem diversos tipos de SOD's com variados cofatores associados, como por exemplo nas mitocôndrias de células humanas, onde a

enzima detém manganês (Mn) em seu sítio ativo, ou no interior do citosol onde a enzima pode ter cobre (Cu) ou Zinco (Zn) no seu sitio ativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE,1999). As enzimas GPX e CAT são responsáveis por interferir no acúmulo da espécie reativa H₂O₂ (BARBOSA et al., 2010). A catalase converte H₂O₂ em O₂ e água, já GPX está relacionada a função antioxidante da glutatona na forma reduzida (GSH) com atividade peroxidásica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O sistema antioxidante não-enzimático é adquirido por fontes dietéticas, sendo eles minerais como o magnésio, o selênio, o zinco e o cobre, e também vitaminas e seus precursores como a vitamina E, a vitamina A e carotenoides como o licopeno e luteína (BARBOSA et al., 2010), entre outros.

A atividade das enzimas contribui para a minimização de danos de origem oxidativa, pelos mecanismos de prevenção, eliminação e controle de radicais livres, impedindo, assim, muitas vezes, a propagação de reações em cadeia que culminem em dano celular (BARBOSA et al., 2010). Situações, por exemplo, em que ocorrem mutações capazes de alterar o potencial de defesa dessas enzimas podem contribuir para a formação de estresse oxidativo em um ambiente. Assim como o excesso de enzimas antioxidantes pode ser prejudicial por perturbar o equilíbrio, que deve ocorrer, entre produção e eliminação de radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

2.2.4 Algas marinhas e estresse oxidativo

Algas marinhas, como organismos fotossintetizantes, são expostas a elevadas concentrações de luz e oxigênio em seu habitat natural, promovendo conseqüentemente a formação de agentes oxidantes fortes e radicais livres (ROCHA et al., 2007). No aparato fotossintético, um alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados fazem parte da estrutura da membrana dos tilacóides (ROCHA et al., 2007), sendo um dos constituintes celulares especialmente vulneráveis aos danos fotodinâmicos. No entanto, as algas apresentam-se estáveis à oxidação (RAMARATHNAM et al., 1995), sugerindo assim a presença de mecanismos e de componentes antioxidantes (MATSUKAWA et al., 1997). Vários mecanismos de ação vem sendo propostos afim de explicar a atividade antioxidante observada em extratos de algas marinhas. Dentre estes encontram-se mecanismos que envolvem

a doação e o recebimento de elétrons, a eliminação de radicais livres e a capacidade de interferir em processos que ocasionem principalmente a peroxidação lipídica (ROCHA et al., 2007).

A constituição química das algas marinhas de acordo com a organização das suas estruturas, propicia um desempenho efetivo a processos antioxidantes. A presença de compostos vitamínicos hidrossolúveis como a vitamina C e lipossolúvel como a vitamina E; a presença de elementos como o cobre, o zinco, o selênio e o manganês, fundamentais para regulação de enzimas antioxidantes (BATISTA et al., 2009); a presença em algumas espécies de algas de aminoácidos microsporinas, capazes de absorver radiação ultravioleta (UV) afim de diminuir os efeitos maléficos provocados por ela (SHICK E DUNLAP, 2002); são exemplos de que a organização e constituição celular das algas contribuem para a manutenção da homeostasia.

Portanto, partindo-se do princípio que as algas marinhas são organismos expostos a intensa luminosidade e produzem altas concentrações de oxigênio, as algas passaram a apresentar-se como fortes sistemas antioxidantes em reflexo as circunstâncias altamente oxidativas em que vivem (ROZEMA et al., 2002).

2.3 Ácidos graxos ômega-3

Os ácidos graxos ômega-3 são por convenção ácidos graxos poli-insaturados que apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 3 e 4 a partir da terminação metil (NELSON et al., 2008), podendo apresentar até 6 ligações duplas. O DHA, com um total de 22 carbonos e seis duplas ligações, e o EPA, o qual apresenta um total de 20 carbonos e 5 duplas ligações são exemplos de ômega-3 (SIJTSMa e SWAAF, 2004), exemplificados na figura 6, os quais não são capazes de serem produzidos por espécies animais. Presentes em quantidades significativas em óleos de peixe, o crescente interesse nesses compostos é devido as suas notórias propriedades benéficas para a saúde quando integrados na dieta, o que passou a motivar o estudo do seu potencial em múltiplas frentes de aplicações.

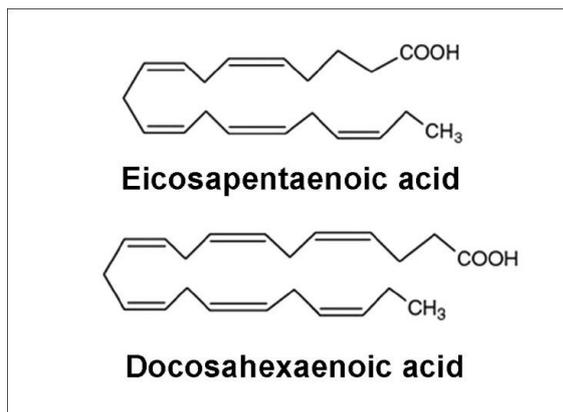


Figura 6 – Estrutura dos ácidos eicosapentaenoico e docosaneico. Fonte: Peter et al., 2013.

A propriedade antioxidante *in vivo* do EPA é sugerida em função dos resultados encontrados em pacientes, com prescrição da ingestão deste componente, nos mais diversos tipos de tratamentos, onde observa-se a regulação positiva de enzimas antioxidantes (MAHMOUDABADI e RAHBAR, 2014). Ensaio *in vitro* (VAN DEN ELSEN et al., 2013) e *in vivo* (OKABE et al., 2011; PALANISWAMY et al., 2014) tem reportado a supressão de ROS por parte do EPA, assim como também vem fornecendo dados confirmatórios dos efeitos antioxidantes deste componente. Ainda, a inibição da ativação de enzimas como a NADPH-oxidase – geradora de radical livre reativo superóxido – em ensaios com células cancerosas, foi capaz de impedir o aumento induzido de ROS intracelular (MORRE et al., 2010), concordando com outros estudos que indicam a atividade de eliminação de ROS realizado por ácidos graxos n-3 (RICHARD et al., 2008). Outro indício sugere que o EPA apresenta também atividade modulatória, reduzindo a produção de ROS por intermédio de reguladores mitocondriais da produção de peróxido de hidrogênio (TAKAHASHI et al., 2002). Também tem sido sugerido por diversos investigadores que por interferência direta o EPA poderia proporcionar a ativação de vias de sinalização ROS-sensíveis (MULLEN et al., 2010; VAN DEN ELSEN et al., 2013). É significativo também a capacidade do EPA de originar diferentes compostos mediadores em decorrência da sua origem lipídica, como resolvinas da série E, moléculas em que relata-se uma importante atividade anti-inflamatória (SEKI et al., 2009). Neste caso, é provável que o efeito antioxidante seja causa e simultaneamente consequência do efeito anti-inflamatório que são presenciados em diversas situações *in vivo*. O ácido graxo DHA é também investigado quanto à suas características anti-inflamatórias e antioxidantes (GIUDETTI e CAGNAZZO, 2012).

Porém, relata-se repostas diferentes a níveis quantitativos e qualitativos da ação de EPA e DHA (RUSSELL e BÜRGIN-MAUNDER, 2012).

Em função, portanto, de sua possível atividade antioxidante e anti-inflamatória (RICHARD et al., 2008; VAN DEN ELSEN et al., 2013), a eficiência do EPA tem sido verificado utilizando-se modelos de inflamações crônicas em animais. Neste sentido, vem sendo verificado o seu potencial em lesões cerebrais isquêmicas em roedores (OKABE et al., 2011), mostrando a capacidade de aumento da expressão de mRNA de enzimas antioxidantes como a heme-oxigenase 1 (HO-1) em adipócitos em situações de estresse oxidativo (KUSUNOKI et al., 2013). O ômega-3 também mostrou a capacidade de modular a atividade de enzimas como a CAT e a SOD em roedores com diabetes (DE ASSIS et al., 2012), e em roedores expostos a compostos poluentes orgânicos (PALANISWAMY et al., 2014). O mesmo também tem sido verificado em indivíduos acometidos por diabetes do tipo 2 (MAHMOUDABADI e RAHBAR, 2014).

2.4 Terapia celular

A terapia celular apresenta como objetivo funcionalizar um tecido lesado, por intermédio de um transplante celular. As células utilizadas para este fim podem ser de vários tipos, no entanto, um tipo bastante preconizado são as células tronco. Estas células podem ser definidas como células não diferenciadas caracterizadas por uma importante plasticidade, e um elevado potencial de auto-renovação e proliferação (FUCHS e SEGRE, 2000; YANG et al., 2009). Em decorrência destas propriedades, elas fazem parte de investigações para o remodelamento e a reconstituição funcional de lesões teciduais (AGHA-HOSSEINI et al., 2010). A classificação definida a essas células está organizada em células embrionárias, células somáticas pluripotentes induzidas (iPSCs) e células tronco adultas.

As células tronco embrionárias provem da massa celular interna do blastocistos, sendo capazes de indefinidos perfis de multiplicações e de se diferenciar em qualquer tipo célula constituinte de um indivíduo adulto (EVANS e KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). As iPSCs são formadas a partir da técnica de reprogramação direta, a qual induz a pluripotência em células somáticas (YAMANAKA, 2007; TAKAHASHI et al., 2007), através da transfecção, mediada por

retrovírus, de determinados fatores de transcrição proporcionando às células somáticas a capacidade de expressar as propriedades e morfologia semelhantes as células tronco embrionárias (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006). As células tronco adultas, são provenientes de tecidos especializados do momento pós-embrionário, porém são consideradas indiferenciadas e de caráter multipotente (YANG et al., 2009). Estas células tronco adultas estão presentes em vários tecidos, como no sistema nervoso central (SVENDSEN et al., 1999), no coração (URBANEK et al., 2003), no bulbo olfativo (YUSTA-BOYO et al., 2004), na glândulas mamárias (SHACKLETON et al., 2006), na epiderme (BENITAH et al., 2005), no tecido adiposo (AUST et al., 2004), no folículo capilar (DOTTO e COTSARELIS, 2005), nos olhos (KOIZUMI et al., 2001), nos dentes (SLOAN e SMITH, 2007) e na medula óssea (CHEN et al., 2006).

O processo inflamatório desenvolvido após uma injúria, promove a geração de um ambiente com altas quantidades de espécies reativas, significativamente proporcionada pelos mecanismos de atuação das células de defesa do sistema imune (KHANNA et al., 2014). A adesão, multiplicação, diferenciação e liberação de fatores tróficos realizado por células tronco em terapias celulares (CAPLAN e Dennis, 2006; VALLE-PRIETO et al., 2010) pode ser comprometida pela hostilidade presente no local de injúria, devendo-se desenvolver processos adaptativos que promovam condições a essas células suportarem as adversidades.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Em função do potencial antioxidante da *Gigartina skottsbergii* e devido a recorrente busca por métodos capazes de reverter eficientemente à um ambiente de estresse oxidativo, esse estudo teve por objetivo avaliar a capacidade da alga *Gigartina skottsbergii* em promover a manutenção ou melhoria da viabilidade celular sobre as células de fibroblastos NIH/3T3, após a exposição ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade das células NIH/3T3 mediante a exposição a diferentes concentrações da porção lipídica da alga *Gigartina skottsbergii*.
- Avaliar viabilidade das células NIH/3T3 mediante ao tratamento prévio com a porção lipídica de *Gigartina skottsbergii* e posterior exposição ao H₂O₂.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Os protocolos experimentais foram realizados em forma de duplicata cada um repetidos três vezes.

4.1.1 Obtenção da fração lipídica da alga *G. skottsbergii*

A alga *Gigartina skottsbergii* foi cedida pela Universidad de Magallanes localizada no Chile. A fração lipídica da *G. skottsbergii* foi extraída, purificada e caracterizada mediante cooperação dos Programas de Pós-graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas no Laboratório de Neurociências Clínicas e do Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas.

4.1.2 Linhagem celular e cultivo celular

A linhagem celular de fibroblastos provenientes de embriões de camundongos (NIH/3T3) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O cultivo das células foi realizado no Laboratório De Cultivo Celular da faculdade de Odontologia da UFPEL.

Para a realização dos ensaios, as células armazenadas no interior de um botijão de nitrogênio líquido, foram descongeladas. Para tanto, retirou-se um tubo criogênico contendo células NIH/3T3 do interior do botijão e manteve-se o mesmo em banho-maria a 37°C até o conteúdo tomar a forma líquida. Em seguida, no interior da capela de fluxo laminar transferiu-se as células para o interior de uma garrafa de cultivo (TPP, St. Louis, MO, EUA) com 25 cm² de superfície. Então realizou-se a suplementação com Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, EUA). A garrafa foi levada para a estufa sob a temperatura de 37°C, em condição de atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após 24 horas, tendo havido adesão celular na parede de fundo da garrafa de cultivo, fez-se a troca do meio.

As trocas do meio de cultura foram realizadas quando o meio apresentava alteração de cor, indicando alteração no pH, assim como quando haviam muitas

células em suspensão. Para tanto, o meio de cultivo pré-existente era retirado, utilizando-se pipetas de 10mL, e após, desprezado. As células aderidas na garrafa foram lavadas utilizando o tampão fosfato salino (PBS) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) na concentração de 1%, o mesmo foi removido e 10 mL de meio de cultivo novo foi adicionado.

Ao atingir 80% de confluência realizou-se o repique celular. Inicialmente desprezou-se o meio de cultivo pré-existente no interior da garrafa, lavou-se as células com 2 mL de 1% PBS. Adicionou-se 2 mL de 0,25% Tripsina-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para proceder a desadesão celular e realizou-se o acompanhamento no microscópio invertido TS100-F da marca Nikon (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Inativou-se a ação enzimática acrescentando 2 mL de meio de cultivo, e então realizou-se a ressuspensão do meio para desagregar completamente as células. Em sequência, adicionou-se 8 mL de meio, ressuspendeu-se o líquido total e fez-se a passagem celular, na razão de 1:2. As garrafas foram, então, levadas para estufa sob a temperatura de 37°C, em condição de atmosfera úmida e 5% de CO₂. Nas passagens seguintes, o processo de repique foi realizado em razão de 1:3. Trocas do meio de cultura foram realizadas quando o meio apresentava alteração de cor ou quando haviam muitas células em suspensão.

Para a realização dos ensaios de viabilidade foi seguido as normas ISO 10993-5 (2009). Inicialmente, as células foram colocadas em placas de 96 poços (TPP, St. Louis, MO, EUA) em uma densidade de 2×10^4 por poço em um volume de 100 µL de meio de cultivo. As células foram então armazenadas em uma estufa sob temperatura de 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂ por 24 horas antes da realização do teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) com 20 µl por poço.

4.2 Protocolo experimental 1 - Ensaio de viabilidade celular da fração lipídica da alga *Gigartina skottsbergii*

O protocolo experimental 1 foi realizado no intuito de avaliar se a fração lipídica da alga *G. skottsbergii* seria prejudicial a viabilidade das células NIH/3T3, conforme descrito no objetivo 1. Para tanto as placas, contendo as células na densidade de 2×10^4 por poço e incubadas por 24 horas (descritas no item 4.1.2), foram acrescidas de 100 µL da fração lipídica da alga *Gigartina skottsbergii* nas

concentrações de 1, 10, 20, 50 e 100 µg/mL. O grupo controle consiste em células NIH/3T3 com apenas o meio de cultivo celular/suplemento comum a célula. As placas foram então incubadas por 24 e 48 horas em estufa nas condições de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Após este período realizou-se o ensaio colorimétrico de MTT.

4.3 Protocolo experimental 2 - Avaliação da viabilidade celular mediante o pré-tratamento com *Gigartina skottsbergii* e insulto com peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

4.3.1 Insulto com peróxido de hidrogênio

As placas, contendo as células na densidade de 2x10⁴ por poço e incubadas por 24 horas (descritas no item 4.1.2), foram acrescidas de 100 µL da fração lipídica da alga *Gigartina skottsbergii*, nas concentrações de 1, 10, 20, 50 e 100 µg/mL. As placas foram então incubadas por 2 e 6 horas em estufa nas condições de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Decorrido esses intervalos de tempo, o meio de cada poço foi desprezado e 100 µl de uma solução composta por meio de cultivo e H₂O₂ em concentrações finais de 1, 10, 50 e 100 uM foi adicionado. Controles foram elaborados afim de obter-se parâmetros de avaliação dos ensaios. Para tanto, um grupo controle consistindo em células NIH/3T3 com apenas o meio de cultivo celular/suplemento comum as células (Controle-Meio); e o outro grupo controle em células expostas a somente ao agente oxidante (H₂O₂) nas concentrações de 50, 100 e 500 uM (Controle- H₂O₂). As placas foram novamente incubadas por 6 e 12 horas em estufa nas condições de 5% de (CO₂) e temperatura de 37°C. Após este período realizou-se o ensaio colorimétrico de MTT.

4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos através dos ensaios de viabilidade celular foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias com o teste de Tukey, como análise *post hoc* quando necessário. Para todos os testes p < 0,05 foi considerado como significativo. A elaboração dos gráficos foi realizada através do programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 - Viabilidade celular da fração lipídica da alga *Gigartina skottsbergii*

O resultado de viabilidade das células NIH/3T3 frente as diferentes concentrações testadas (1, 10, 20 50, 100 ug/mL) da fração lipídica da alga *G. Skottsbergii* demonstrou não haver diferença estatística significativa entre os grupos testados (P=0,867).

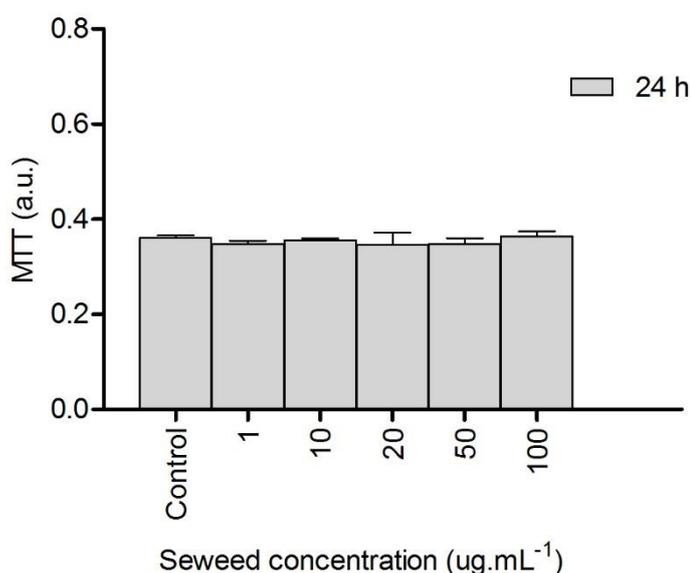


Figura 7 - Gráfico do protocolo experimental 1. Efeito das diferentes concentrações da fração lipídica da alga *G. skottsbergii* (1, 10, 20 50, 100 ug/mL) na viabilidade das células NIH/3T3 após o tempo de exposição de 24 horas. O valor de P<0,05 foi considerado significativo (Tukey test).

5.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 - Viabilidade celular mediante o pré-tratamento com *G. skottsbergii* e insulto com peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Após a verificação de que a fração lipídica da alga *G. Skottsbergii* não alterou a viabilidade das células NIH/3T3 nas diferentes concentrações testadas em um período de 24 horas, partiu-se para o protocolo experimental 2, buscando contemplar o segundo objetivo do estudo. Quando as células foram expostas a concentração de 50 uM de H₂O₂ por 6 horas mediante ao pré-tratamento com a fração lipídica da alga *G. Skottsbergii* por 2 e 6 horas, não houve diferença estatística significativa entre as diferentes concentrações testadas e o grupo controle

($P=0,372$). Assim como não houve uma diferença significativa entre os tempos de pré-tratamento com a alga ($P=0,679$).

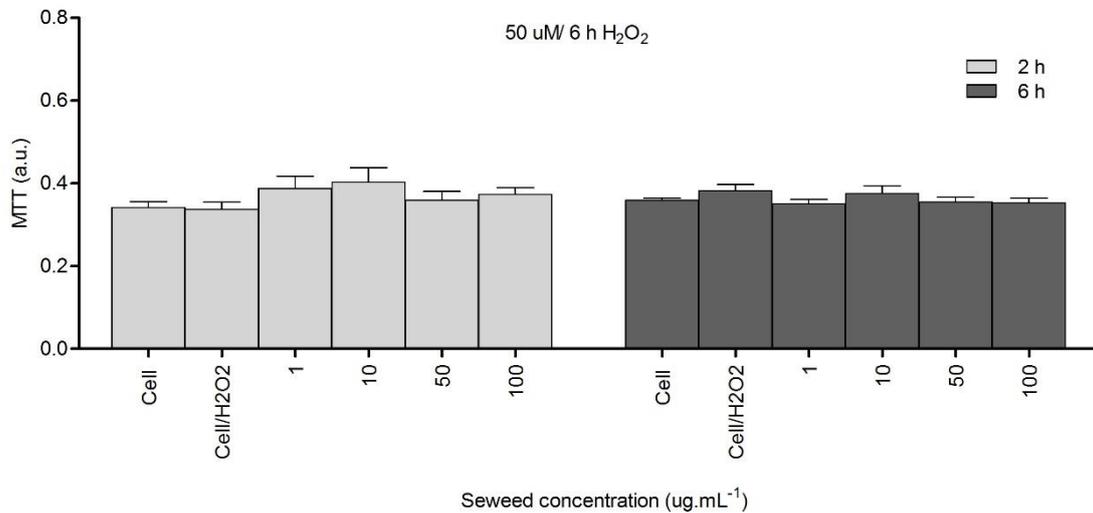


Figura 8 - Gráfico protocolo experimental 2 com 50 μM de H_2O_2 por 6 h. Viabilidade das células NIH/3T3 ao serem submetidas a diferentes concentrações da alga *G. skottsbergii* (1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por períodos de tempo de 2 e 6 horas, seguido de 6 horas de insulto com 50 μM H_2O_2 . O valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo (Tukey test).

Quando somente o tempo de exposição ao H_2O_2 foi alterado de 6 para 12 horas, observa-se um aumento de viabilidade estatisticamente significativa no grupo exposto ao pré-tratamento por 6 horas com a fração lipídica da alga em relação ao pré-tratamento de 2 horas ($P=0,018$). Dentre os grupos que apresentaram a maior viabilidade celular encontra-se (pré-tratamento de 2 e 6 horas): células+ H_2O_2 somente e células expostas a 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pré-tratamento com a alga ($P=0,000$).

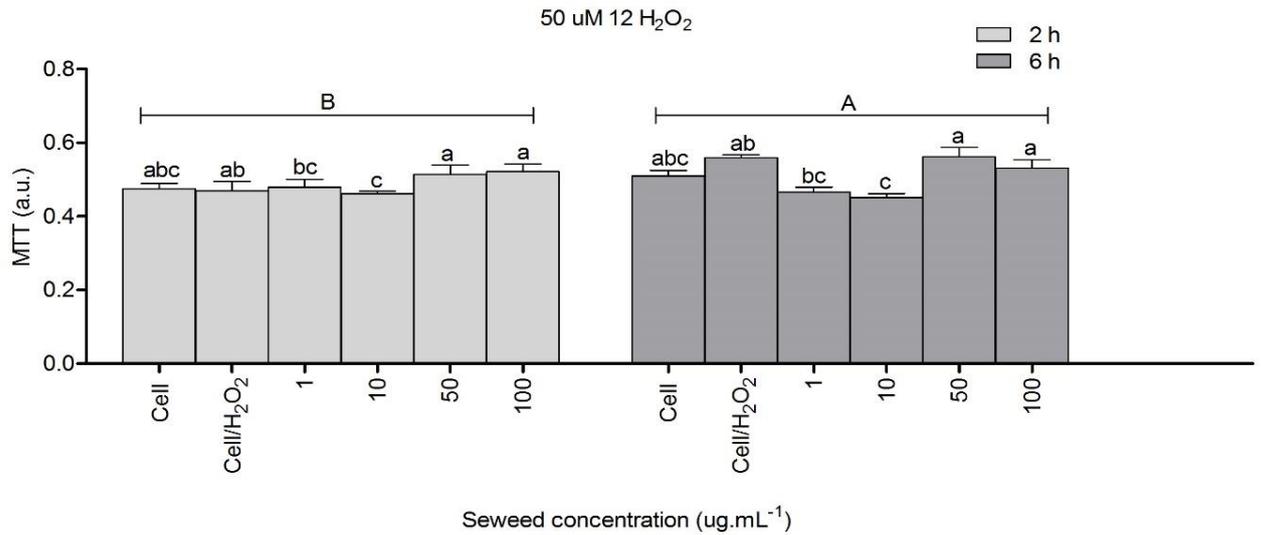


Figura 9 - Gráfico protocolo experimental 2 com 50 uM de H₂O₂ por 12 h Viabilidade das células NIH/3T3 ao serem submetidas a diferentes concentrações da alga *G. skottsbergii* (1, 10, 50, 100 ug/mL), por períodos de tempo de 2 e 6 horas, seguido de 12 horas de insulto com 50 uM H₂O₂. As letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao tempo de exposição no pré-tratamento (2 e 6 horas). As letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre as concentrações testadas e grupos controles. O valor de P<0.05 foi considerado significativo (Tukey test).

Mediante ao aumento da concentração de H₂O₂ de 50 uM para 100 uM em um tempo de exposição de 6 horas observa-se que os grupos que obtiveram a maior viabilidade estatisticamente significativa foram aqueles com o pré-tratamento de 50 e 100 ug/mL com 2 horas de exposição e 10 e 100 ug/mL (P=0,011). Possuindo, portanto uma viabilidade celular maior que os grupos Controle-H₂O₂ e Controle-Meio. Contudo, não são observados valores estatisticamente significativos de viabilidade celular entre os grupos Controle-H₂O₂ e Controle-Meio.

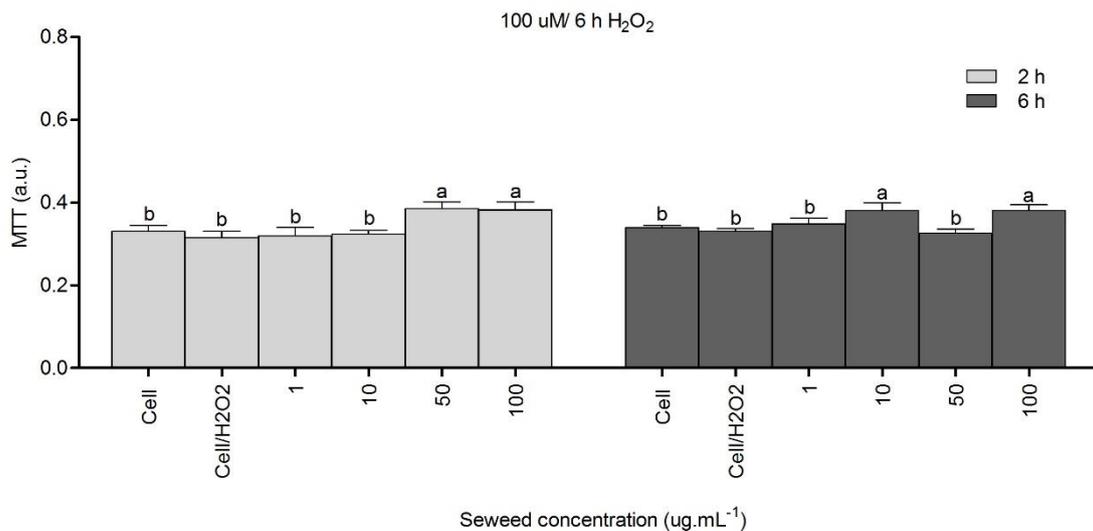


Figura 10- Gráfico protocolo experimental 2 com 100 uM de H₂O₂ por 6 h Viabilidade das células NIH/3T3 ao serem submetidas a diferentes concentrações da alga *G. skottsbergii* (1, 10, 50, 100 ug/mL), por períodos de tempo de 2 e 6 horas, seguido de 6 horas de insulto com 100 uM H₂O₂. O valor de P<0.05 foi considerado significativo (Tukey test).

Quando a concentração de H₂O₂ foi mantida em 100 uM porém o tempo de exposição foi aumentado para 12 horas, observa-se que o grupo Controle-H₂O₂ possui uma viabilidade celular inferior que a do grupo Controle-Meio no período de pré-tratamento de 6 horas (p=0,000). Verifica-se ainda que dentre todos os grupos pré-tratados por 2 e 6 horas com a fração lipídica da alga o grupo tratado com 50 e 100 ug/mL por 6 horas obtiveram a maior viabilidade celular (P=0.006).

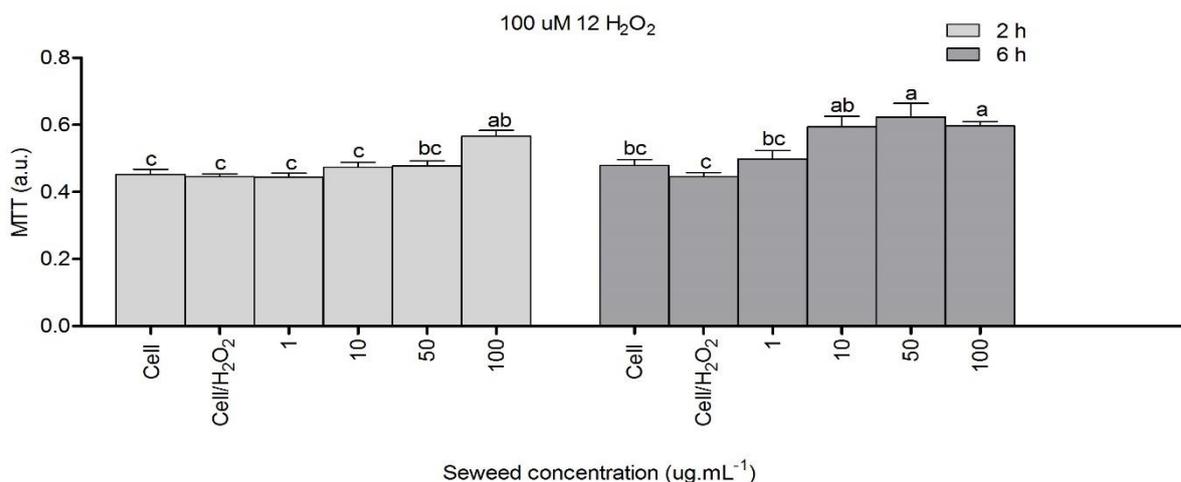


Figura 11 - Gráfico protocolo experimental 2 com 100 uM de H₂O₂ por 12 h Viabilidade das células NIH/3T3 ao serem submetidas a diferentes concentrações da alga *G. skottsbergii* (1, 10, 50, 100 ug/mL), por períodos de tempo de 2 e 6 horas, seguido de 12 horas de insulto com 100 uM H₂O₂. O valor de P<0.05 foi considerado significativo (Tukey test).

No tempo de exposição de 6 (P=0,000) e 12 horas (P=0,000) de H₂O₂ em uma concentração de 500 µM, observa-se uma diferença estatística significativa

entre o grupo Controle-Meio e os demais grupos (Controle-H₂O₂ e concentrações testes). Contudo, o grupo pré-tratado com 6 horas da fração lipídica da alga obtiveram, em conjunto, uma maior viabilidade celular quando comparados ao grupo exposto por 2 horas.

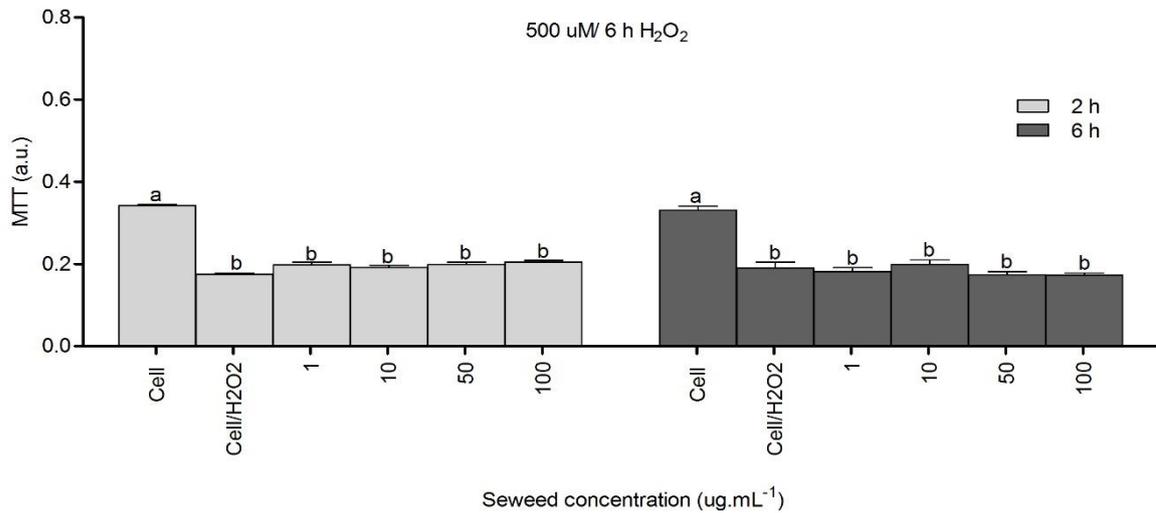


Figura 12 - Gráfico protocolo experimental 2 com 500 uM de H₂O₂ por 6 h Viabilidade das células NIH/3T3 ao serem submetidas a diferentes concentrações da alga *G. skottsbergii* (1, 10, 50, 100 ug/mL), por períodos de tempo de 2 e 6 horas, seguido de 6 horas de insulto com 500 uM H₂O₂. O valor de P<0.05 foi considerado significativo (Tukey test).

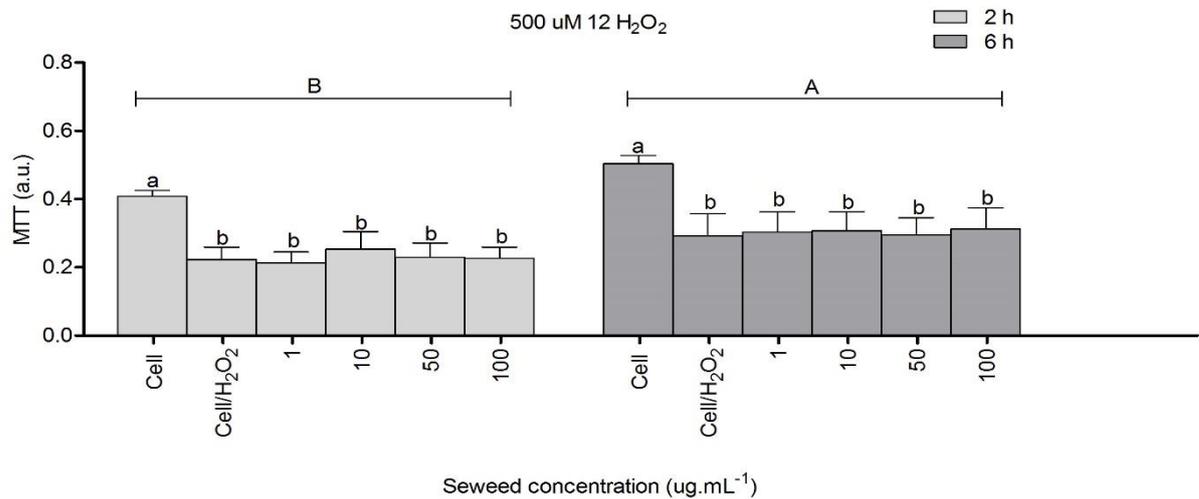


Figura 13 - Gráfico protocolo experimental 2 com 500 uM de H₂O₂ por 12 h Viabilidade das células NIH/3T3 ao serem submetidas a diferentes concentrações da alga *G. skottsbergii* (1, 10, 50, 100 ug/mL), por períodos de tempo de 2 e 6 horas, seguido de 12 horas de insulto com 500 uM H₂O₂. As letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao tempo de exposição no pré-tratamento (2 e 6 horas). As letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre as concentrações testadas e grupos controles. O valor de P<0.05 foi considerado significativo (Tukey test).

6. DISCUSSÃO

A fração lipídica da *G. skottsbergii* é majoritariamente representada por EPA, encontrado em um percentual de 25,2%, e AA correspondendo a 22,2% (GRAEVE et al., 2002). O AA é um ácido graxo da família ômega-6, integrante das membranas celulares junto a porção fosfolipídica. Nos humanos o AA exerce um papel fundamental em situações inflamatórias e na fisiopatologia em geral (ASTUDILLO et al., 2012). O EPA, da família ômega-3, mostra-se capaz de substituir o AA em porções fosfolipídicas diminuindo assim a quantidade disponível de AA a nível de substrato (JHO et al., 2004). Inicialmente no presente estudo investigamos se a fração lipídica da *G. skottsbergii* poderia demonstrar-se tóxicas para fibroblastos NIH/3T3 diminuindo a sua viabilidade celular. Os resultados demonstraram que mediante a exposição das células por 24 horas com diferentes concentrações da fração lipídica da alga, não houve alteração da viabilidade celular quando comparados com o grupo controle. Em concordância com o estudo realizado por Van den Elsen (2012) que com uma linhagem celular de mastócitos humanos “*Human leukaemic mast cell line*” (HMC-1) demonstrou que o AA, o EPA e o DHA nas concentrações de 1, 10, 25 e 100 μM , por um período de 48 horas também não foram capazes de demonstrar alteração em relação a viabilidade celular.

A pré-incubação das células NIH/3T3 com a fração lipídica da alga *G. skottsbergii* foi incentivada pelos relatos reportados através da literatura das propriedades antioxidantes dos ômega-3 em geral, e particularmente do EPA (AZIZI-SOLEIMAN et al., 2013; PALANISWAMY et al., 2014). Ao longo do tempo, as observações feitas com relação a dieta consumida por esquimós a base de animais marinhos como os peixes, dentre os quais uma ampla variedade apresenta uma alimentação baseada na ingestão de algas, fez com que diversos pesquisadores passassem a questionar-se quais substâncias proporcionavam a qualidade de saúde apresentada por estes indivíduos, descobrindo-se assim posteriormente a classe de ácidos graxos ômega-3 (BANG e DYERBERG, 1980). Dentre os mecanismos envolvidos para tal atividade relata-se a modulação de enzimas antioxidantes, como o conteúdo de SOD, visualizado em situações, por exemplo, de experimento em animais, os quais foram alimentados com uma dieta rica em ácidos graxos ômega-3 verificando-se o conteúdo enzimático (DE ASSIS et al., 2012); assim como a

atuação do EPA como um significativo ativador do fator de transcrição, fator nuclear eritróide 2 (Nrf-2), o qual é responsável pela defesa de insultos nas células, modulando a expressão de diversos genes relacionados com o estresse oxidativo (PALANISWAMY et al., 2014; WANG et al., 2010). O fator Nrf-2 é sequestrado pela proteína, *kelch like ECH associated protein 1* (Keap 1), sua repressora citosólica, em condições basais. Porém, em uma situação de estresse oxidativo o Nrf2 é liberado da inibição de Keap1, sendo Nrf2 agora capaz de ativar por meio da transcrição gênica uma resposta antioxidante (WANG et al., 2010). Kusunoki (2013) relatou que PUFA ômega-3 exerce um efeito de molécula antioxidante em adipócitos 3T3-L1, promovidos através do aumento da expressão da enzima heme oxigenase 1 (HO-1), ativada por Nrf-2, uma vez que o grupo heme das hemoproteínas intracelulares em condições de estresse oxidativo é liberado. Pelo fato do grupo heme livre ser tóxico para as células e iniciar processos como a peroxidação lipídica, a indução de HO-1 passa a ser uma estratégia para degradação do grupo heme e manutenção da homeostase celular (RYTER e TYRRELL, 2000). O estudo de Han (2010) sugere uma significativa associação entre a ingestão do EPA e o aumento da expectativa de vida em animais, pela atenuação do estresse oxidativo e processos inflamatórios, ocasionados pela maior expressão do receptor *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR γ) e sirtuina (SIRT-1), gene que atrasa a senescência celular e que está relacionado com a regulação de enzimas antioxidantes como a SOD (TAO et al., 2010). Estes resultados vêm ao encontro, e em parte podem justificar, a capacidade protetiva, sobre as células NIH/3T3, do pré-tratamento com a fração lipídica da alga nas diferentes concentrações testadas, mediante ao insulto com 100 μ M de peróxido de hidrogênio.

A concentração de 50 μ M de H₂O₂ por 6 e 12 horas foi utilizada como uma concentração inicial para definir o padrão de comportamento celular de acordo com o aumento gradativo de insulto. O resultado mais significativo nesta concentração, e que motivou a duplicação da concentração para análise da resposta celular, ocorreu quando as células foram insultadas por 12 horas diante do pré-tratamento realizado, principalmente, em 6 horas. O pré-tratamento com 50 e 100 μ g/mL da fração lipídica promoveu um aumento da viabilidade celular. Contudo, observa-se que o grupo Controle-H₂O₂ também teve um aumento da viabilidade celular quando comparado ao grupo Controle-Meio. É de comum acordo na literatura que o estresse oxidativo,

quando em concentrações elevadas, pode atuar essencialmente no dano celular (VALLE PRIETO e CONGET, 2010). No entanto, em concentrações menores o mesmo pode participar de vias de sinalização celular e influenciar diretamente em fatores de transcrição gênica (GORLACH et al., 2015; HADDAD, 2002). Assim, possivelmente os resultados de maior viabilidade celular referentes ao pré-tratamento com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ da fração lipídica, possivelmente somatizam o comportamento frente a alga, uma vez que este grupo obteve uma viabilidade maior que o grupo Controle- H_2O_2 indicando uma diferença pela pré-incubação, e a possível sinalização positiva modulada pelo H_2O_2 , uma vez que é sabido a propriedade sinalizadora por si só realizada pela sua presença.

Em virtude destes resultados aumentou-se a concentração de H_2O_2 para 100 μM . Mediante a exposição ao H_2O_2 por 6 horas, o grupo Controle- H_2O_2 mostrou uma viabilidade celular igual ao grupo Controle-Meio. Contudo, as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, no pré-tratamento de 2 horas, e as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, no pré-tratamento de 6 horas, da fração lipídica mostraram um aumento da viabilidade celular em relação aos grupo controles e demais concentrações testadas. Quando aumentou-se o tempo de exposição de 100 μM de H_2O_2 para 12 horas, obteve-se o resultado desejado, com redução estatisticamente significativa da viabilidade do grupo Controle- H_2O_2 em relação ao grupo Controle-Meio. Observa-se que o pré-tratamento com 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ da fração lipídica da alga, por um período de 6 horas, aumentou consideravelmente a viabilidade das células NIH/3T3. Neste contexto pode ser sugerido que o aumento da viabilidade ocorra devido a capacidade antioxidante do EPA o qual, pelos mecanismos descritos acima, poderia atuar neutralizando os efeitos danosos provocados pelo H_2O_2 .

Mediante esses resultados poderia ser proposto, no âmbito de terapia celular, realizar-se um pré-tratamento das células com a fração lipídica da alga *G. Skottsbergii* por 6 horas utilizando-se a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, no intuito de garantir uma maior viabilidade das células quando implantados nos sítios de reparo ou regeneração. Tem sido descrito na literatura que ambientes com altos níveis de estresse oxidativo interferem negativamente na adesão celular (AUGST et al., 2006) e, por conseguinte, interferem na diferenciação, produção e liberação de fatores tróficos, neovascularização e imunomodulação (CAPLAN e DENNIS, 2006; VALLE-PRIETO et al., 2010). Ainda a pré-incubação de células com a fração lipídica da alga

G. skottsbergii, com a finalidade de terapia celular, sugestivamente poderia auxiliar no estímulo à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que o EPA apresenta uma expressiva ação anti-inflamatória (WANG et al., 2010). O mecanismo proposto para essa ação é a de que ácidos graxos ômega-3 são capazes de suprimir vias de ativação do fator nuclear kappa beta (NFκB) por intermédio de Nrf2 (THIMMULAPPA et al., 2006). O trabalho de Gao (2007) mostra que quando o EPA é submetido a uma situação de oxidação *in vitro*, na sua forma oxidada, ele promove uma interação de forma direta com Keap1, dissociando a porção Nrf2 de Keap1, liberando Nrf2 para expressão (GAO et al., 2007). A resposta anti-inflamatória proporcionada por essa expressão não é completamente elucidada e ainda necessita ser melhor investigada (WANG et al., 2010; GAO et al., 2007). O fator de transcrição, fator nuclear kappa beta (NF-κB) é responsável por ativar genes pró-inflamatórios, como por exemplo ciclo oxigenase 2 (COX-2), envolvidos na fase aguda da inflamação (BAEUEERLE, 1998). A ativação de SIRT-1 também está intimamente associado com a supressão do estresse oxidativo pela inibição que ocorre sobre NFκB (KUBOTA et al., 2009). Como AA é o substrato para a confecção de leucotrienos da série 4 e prostanóides da série 2, mediadores de inflamação, a substituição que o EPA executa colocando-se na membrana fosfolipídica, faz com que ocorra uma diminuição da quantidade destes compostos biologicamente ativos (JHO et al., 2004). O EPA também disputa com AA as enzimas ciclo oxigenase 1 (COX-1) e ciclo oxigenase 2, (COX-2) assim com lipoxigenases, diminuindo a produção anti-inflamatória (JHO et al., 2004; RINGBOM et al., 2001).

Na tentativa de extrapolar a capacidade celular de tolerar o estresse oxidativo, as células NIH/3T3 foram expostas a concentração de 500 μM de H₂O₂ por 6 e 12 horas. Observou-se a diminuição da viabilidade celular em todas as concentrações da fração lipídica da alga, tanto no pré-tratamento com 2 horas como com 6 horas. A explicação para a baixa viabilidade pode estar relacionado com o mecanismo de peroxidação lipídica provocada pela oxidação do conteúdo lipídico, intensificado pelo aumento de espécies reativas no local.

Contudo, entendemos que mais estudos devam ser realizados a respeito de rotas de sinalização deste composto, assim como ensaios em modelos animais, para que possam ser vislumbrados quaisquer aplicações clínicas.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a conjuntura proporcionada pela interação de uma célula NIH/3T3 com a fração lipídica da alga *Gigartina skottsbergii*, afim de testar diferentes concentrações do extrato e avaliar sua potencial toxicidade. Em nenhuma das concentrações testadas foi observado a inviabilidade celular. Ainda verificou-se que o tratamento prévio com a fração lipídica desta alga foi capaz de promover um efeito protetor sobre as células NIH/3T3, aumentando a sua viabilidade. Neste sentido este trabalho permite vislumbrar a possibilidade de um tratamento prévio das células com a fração lipídica desta alga antes da sua aplicação em terapias celulares que envolvam a implantação em locais com altos níveis de estresse oxidativo, como em lesões teciduais.

8. REFERÊNCIAS

AGHA-HOSSEINI, F.; JAHANI, M. A.; JAHANI, M.; MIRZAI-DIZGAH, I.; ALI-MOGHADDAM, K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. **Clinical transplantation**, v. 24, n.2, p. E23-E28, 2010

AL-FADHLI, A.; WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L. Glycolipids from the red alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura. **Glycobiology**, v. 16, n. 10, p. 902-915, 2006.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, n.17, p. 7915-7922, 1993

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n.2, p. 199-212, 1998.

ASTUDILLO, A. M.; BALGOMA, D.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n.2, p. 249-256, 2012.

AUGST, A. D.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. **Macromolecular bioscience**, v. 6, n.8, p. 623-633, 2006.

AUST, L.; DEVLIN, B.; FOSTER, S. J.; HALVORSEN, Y. D. C.; HICOK, K.; DU LANEY, T.; ...GIMBLE, J. M. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. **Cytotherapy**, v.6, n. 1, p. 7-14, 2004.

AZIZI-SOLEIMAN, F.; JAZAYERI, S.; EGHTESEADI, S.; RAJAB, A.; HEIDARI, I.; VAFA, M. R.; GOHARI, M. R. Effects of pure eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on oxidative stress, inflammation and body fat mass in patients with type 2 diabetes. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 8, p. 922, 2013.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 141-155, 1997.

BAEUERLE, P. A. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle?. **Current Biology**, v. 8, n. 1, p. 19- 22, 1998.

BANG, H. O.; DYERBERG, J.; SINCLAIR, H. M. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. **The American journal of clinical nutrition**, v. 33, n.12, p. 2657-2661, 1980.

BANKSON, D. D.; KESTIN, M.; RIFAI, N. Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. **Clinics in laboratory medicine**, v. 13, n. 2, p. 463-480, 1993.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. nutr**, v.23, n.4, p. 629-643, 2010.

BATISTA GONZÁLEZ, A. E.; CHARLES, M. B; MANCINI-FILHO, J; VIDAL NOVOA, A. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.14, n. 2, p. 0-0, 2009.

BENITAH, S. A.; FRYE, M.; GLOGAUER, M.; WATT, F. M. Stem cell depletion through epidermal deletion of Rac1. **Science**, v. 309, n. 5736, p. 933-935, 2005.

BISCHOFF-BÄSMANN, B.; WIENCKE, C. TEMPERATURE REQUIREMENTS FOR GROWTH AND SURVIVAL OF ANTARCTIC RHODOPHYTA1. **Journal of Phycology**, v. 32, n. 4, p. 525-535, 1996.

BIXLER, H. J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 321-335, 2011.

BLOUIN, N. A.; BRODIE, J. A.; GROSSMAN, A. C.; XU, P.; BRAWLEY, S. H. Porphyra: a marine crop shaped by stress. **Trends in plant science**, v. 16, n. 1, p. 29-37, 2011.

BORLONGAN, C. V.; KANNING, K.; POULOS, S. G.; FREEMAN, T. B.; CAHILL, D. W.; SANBERG, P. R. Free radical damage and oxidative stress in Huntington's disease. **The Journal of the Florida Medical Association**, v. 83, n. 5, p. 335-341, 1996.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 1007-1024, 2001.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of cellular biochemistry**, v. 98, n.5, p. 1076-1084, 2006.

CHEN, Y.; DONG, X. J.; ZHANG, G. R.; SHAO, J. Z.; XIANG, L. X. Transdifferentiation of mouse BM cells into hepatocyte-like cells. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p. 381-389, 2006.

COLE, K. M.; SHEATH, R. G. **Biology of the red algae**. Cambridge University Press, 1990.

COLLÉN, J.; PORCEL, B.; CARRÉ, W.; BALL, S. G.; CHAPARRO, C.; TONON, T.; POULAIN, J. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the **Archaeplastida**. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 13, p. 5247-5252, 2013.

COLOMBO, D.; COMPOSTELLA, F.; RONCHETTI, F.; SCALA, A.; TOMA, L.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Glycoglycerolipid analogues active as anti-tumor-promoters: the influence of the anomeric configuration. **European journal of medicinal chemistry**, v. 35, n. 12, p. 1109-1113, 2000.

COMMONER, B.; TOWNSEND, J.; PAKE, G. E. Free radicals in biological materials. **Nature**, v.174, n. 4432, p. 689, 1954.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 371-393, 2011.

DE ASSIS, A. M.; RECH, A.; LONGONI, A.; ROTTA, L. N.; DENARDIN, C. C.; PASQUALI, M. A.; Moreira, J. C. Ω 3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. **Molecular and cellular biochemistry**, v.361, n. 1-2, p. 151-160, 2012.

DERMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy conversion and management**, v. 52, n. 1, p. 163-170, 2011.

DI DOMENICO, F.; BARONE, E.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Strategy to reduce free radical species in Alzheimer's disease: an update of selected antioxidants. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 15, n.1, p. 19-40, 2014.

DOTTO, G. P.; COTSARELIS, G. Rac1 Up for Epidermal Stem Cells. **Science**, v. 309, n. (5736), 890-891, 2005.

ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n.4, p. 341-390, 1992.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.

FUCHS, E.; SEGRE, J. Stem Cell: A new lease on life. **Cell**, v. 100, p. 143-155, 2000.

GAMMONE, M. A.; RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N. Marine Carotenoids against Oxidative Stress: Effects on Human Health. **Marine drugs**, v.13, n. 10, p. 6226-6246, 2015.

GAO, L.; WANG, J.; SEKHAR, K. R.; YIN, H.; YARED, N. F.; SCHNEIDER, S. N.;... FREEMAN, M. L. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 4, p. 2529-2537, 2007.

GERSCHMAN, R.; GILBERT, D. L.; NYE, S. W.; DWYER, P.; FENN, W. O. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. **Science of Aging Knowledge Environment**, v. 2005, n.17, 2005.

GIUDETTI, A. M.; CAGNAZZO, R. Beneficial effects of n-3 PUFA on chronic airway inflammatory diseases. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 99, n. 3, p. 57-67, 2012.

GOMBERG, M. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. **Journal of the American chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 757-771, 1900.

GÖRLACH, A.; DIMOVA, E. Y.; PETRY, A.; MARTÍNEZ-RUIZ, A.; HERNANDEZ-AGUSTÍN, P.; ROLO, A. P.; KIETZMANN, T. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved?. **Redox biology**, v.6, p. 372-385, 2015.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 493-507, 2009.

GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox (y)-sensitive transcription factors. **Cellular signalling**, v.14, n.11, p. 879-897, 2002

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals In Biology And Medicine**, 4 ed. Oxford University Press, Oxford, UK, 1987.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental health perspectives**, v. 102, n. (Suppl 10), p. 5, 1994.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HAN, L.; ZHOU, R.; NIU, J.; MCNUTT, M. A.; WANG, P.; TONG, T. SIRT1 is regulated by a PPAR γ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. **Nucleic acids research**, p. 609, 2010.

HARMAN, D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009. **Biogerontology**, v.10, n.6, p. 773-781, 2009.

HOLUB, B. J. Docosahexaenoic acid (DHA) and cardiovascular disease risk factors. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 2, p. 199-204, 2009.

Huang, D.; Ou, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

JHO, DAVID H.; SHAWN M.; COLE, ELLYN.; M. LEE.; N. JOSEPH ESPAT. Role of omega-3 fatty acid supplementation in inflammation and malignancy. **Integrative cancer therapies**, v. 3, n. 2, p. 98-111, 2004.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular diabetology**, v. 4, n.1, p. 5, 2005.

KAMINSKY, V. O.; ZHIVOTOVSKY, B. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21, n. 1, p. 86-102, 2014.

KHANNA, R.; KARKI, K.; PANDE, D.; NEGI, R.; KHANNA, R. Inflammation, free radical damage, oxidative stress and cancer. **Interdiscip J Microinflammation**, v. 1, v. 109, 2014.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L.O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical Reviews in Toxicology**, p. 1-34, 2015.

KOIZUMI, N.; INATOMI, T.; SUZUKI, T.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. **Ophthalmology**, v.108, n.9, p. 1569-1574, 2001.

KUBOTA, S.; KURIHARA, T.; MOCHIMARU, H.; SATOFUKA, S.; NODA, K.; OZAWA, Y.; ... TSUBOTA, K. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and Nuclear factor- κ B activation. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 50, n. 7, p. 3512-3519, 2009.

KUMARI, P.; KUMAR, M.; GUPTA, V.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 749-757, 2010.

KUSUNOKI, C.; YANG, L.; YOSHIZAKI, T.; NAKAGAWA, F., ISHIKADO, A., KONDO, M.; MAEGAWA, H. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 430, n.1, p. 225-230, 2013.

LARIJANI, B.; ESFAHANI, E. N.; AMINI, P.; NIKBIN, B.; ALIMOGHADDAM, K.; AMIRI, S.; ... GHAVAMZADEH, A. Stem cell therapy in treatment of different diseases. **Acta Medica Iranica**, v. 50, n. 2, p. 79-96, 2012.

LORENTE-CEBRIÁN, S.; COSTA, A. G.; NAVAS-CARRETERO, S.; ZABALA, M.; LAIGLESIA, L. M.; MARTÍNEZ, J. A.; MORENO-ALIAGA, M. J. An update on the role of omega-3 fatty acids on inflammatory and degenerative diseases. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 71, n. 2, p. 341-349, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MAHMOUDABADI, M. M. S.; RAHBAR, A. R. Effect of EPA and vitamin C on superoxide dismutase, glutathione peroxidase, total antioxidant capacity and malondialdehyde in type 2 diabetic patients. **Oman medical journal**, v.29, n.1,p. 39, 2014.

MANSILLA, A.; ÁVILA, M.; YOKOYA, N. S. Current knowledge on biotechnological interesting seaweeds from the Magellan Region Chile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.4, p. 760-767, 2012.

MARTIN G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proceedings of the **National Academy of Sciences of the United States of America**. v.78, n. 12, p. 7634-8, 1981.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKI, K.; MASUDA, Y., TAKEUCHI, T.; KARUBE, I. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 1, p. 29-35, 1997.

MAZZA, M.; POMPONI, M.; JANIRI, L.; BRIA, P.; MAZZA, S. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: an overview. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 1, p. 12-26, 2007.

MOHAMED, S.; HASHIM, S. N.; RAHMAN, H. A. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 2, p. 83-96, 2012.

MORRE, J.; MORRÉ, D. M.; BRIGHTMORE, R. Omega-3 but not omega-6 unsaturated fatty acids inhibit the cancer-specific ENOX2 of the HeLa cell surface with no effect on the constitutive ENOX1. **Journal of dietary supplements**, v. 7, n. 2, p. 154-158, 2010.

MULLEN, A.; LOSCHER, C. E.; ROCHE, H. M. Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, n.5, p. 444-450, 2010.

NAKA, K.; MURAGUCHI, T.; HOSHII, T.; HIRAO, A. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 11, p. 1883-1894, 2008.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008.

OKABE, N.; NAKAMURA, T.; TOYOSHIMA, T.; MIYAMOTO, O.; LU, F.; ITANO, T. Eicosapentaenoic acid prevents memory impairment after ischemia by inhibiting inflammatory response and oxidative damage. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 20, n.3, p. 188-195, 2011.

PALANISWAMY, K. S.; VISHWANADHA, V. P.; SINGARAVELU, S. R. Fish oil rich in eicosapentaenoic acid protects against oxidative stress-related renal dysfunction induced by TCDD in Wistar rats. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 3 , p. 409-419, 2014.

PETER, S.; CHOPRA, S.; JACOB, J. J. A fish a day, keeps the cardiologist away!—A review of the effect of omega-3 fatty acids in the cardiovascular system. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 17, n. 3, p. 422, 2013.

PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; REINA, G. G. B.; HERRERO, M.; Señoráns, F. J.; Ibáñez, E. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 2, p. 450-455, 2010.

PLAZA M.; HERRERO M.; CIFUENTES A.; IBANEZ E. Innovative natural functional ingredients from microalgae. **J Agric Food Chem**. v. 57, n.16, p. 7159–70, 2009.

PIRIZ, M. L. Phenology of a *Gigartina skottsbergii* Setchell et Gardner population in Chubut province (Argentina). **Botanica marina**, 39, n. 1-6, p. 311-316, 1996.

POPPER, Z. A.; MICHEI, G.; HERVÉ, C.; DOMOZYCH, D. S.; WILLATS, W. G.; TUOHY, M. G.; STENGEL, D. B. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. **Annual review of plant biology**, v. 62, p. 567-590, 2011.

PORAT, Y.; ABRAHAM, E.; KARNIELI, O.; NAHUM, S.; WODA, J.; ZYLBERBERG, C. Critical elements in the development of cell therapy potency assays for ischemic conditions. **Cytotherapy**, 2015.

PULZ, O.; Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

RAMÍREZ, M. E.; B. SANTELICES. Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica.1991.Pontificia Universidad Católica de Chile: Santiago, 1991.

Ramos, V. A.; Ramos, P. A.; Dominguez, M. C. Papel do estresse oxidativo na manutenção da inflamação em pacientes com artrite reumatóide juvenil. **J pediatr**, v. 76, n. 2, p. 125-32, 2000.

RASMUSSEN, B.; FLETCHER, I. R.; BROCKS, J. J.; KILBURN, M. R. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. **Nature**, v.455, n. 7216, p. 1101-1104, 2008.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. Macmillan. 2005.

RICHARD, D.; KEFI, K.; BARBE, U.; BAUSERO, P.; VISIOLI, F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. **Pharmacological Research**, v.57, n.6, p. 451-455, 2008.

RINGBOM, T.; HUSS, U.; STENHOLM, Å.; FLOCK, S.; SKATTEBØL, L., PERERA, P.; BOHLIN, L. Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. **Journal of natural products**, v. 64 n. 6, p. 745-749, 2011.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 631-639, 2007.

ROSS, B. M.; GLEN, I. Breath Ethane Concentrations in Healthy Volunteers Correlate with a Systemic Marker of Lipid Peroxidation but Not with Omega-3 Fatty Acid Availability. **Metabolites** ,v. 4, n. 3, p. 572-579, 2014.

ROZEMA, J.; BJORN, L. O.; BORNMAN, J. F.; GABERSCIK, A.; HADER, D. P.; TROST, T.; MEJKAMP, B. B. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems—an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, n. 2, p. 12, 2002.

RUSSELL, F. D.; BÜRGIN-MAUNDER, C. S. Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. **Marine drugs**, v. 10, n. 11, p. 2535-2559, 2012.

RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro-and antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 2, p. 289-309, 2000.

SEKI, H.; TANI, Y.; ARITA, M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 89, n.3, p.126-130, 2009.

SHACKLETON, M.; VAILLANT, F.; SIMPSON, K. J.; STINGL, J.; SMYTH, G. K.; ASSELIN-LABAT, M. L.; VISVADER, J. E. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. **Nature**, v. 439, n. 7072, p. 84-88, 2006.

SHICK, J. M.; DUNLAP, W. C. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. **Annual review of Physiology**, v.64, n.1, p. 223-262, 2002.

SIJTSMA, L.; M. E. DE SWAAF. Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. **Applied microbiology and Biotechnology** v. 64, n. 2 , p. 146-153, 2004.

SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. Stem cells and the dental pulp: Potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral Diseases**, v. 13, p. 151-157, 2007.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **Journal of applied phycology**, v. 16, n. 4, p. 245-262, 2004.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology advances**, v.29, n. 5, p. 483-501, 2011.

SVENDSEN, C. N.; CALDWELL, M. A.; OSTENFELD, T. Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. **Brain Pathology**, v. 9, n.3, p. 499-513, 1999.

TAKAHASHI, M.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; NAKATANI, T.; ISHII, M.; TSUTSUMI, S.; ABURATANI, H.; EZAKI, O. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR α activation and ROS production. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 282, n.2, p. 338-348, 2002.

TAKAHASHI K.; YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**. v. 126, n. 4, p. 663-76, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K.. Reactive oxygen species in the vasculature molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n.6, p. 1075-1081, 2003.

TAO, R.; COLEMAN, M. C.; PENNINGTON, J. D.; OZDEN, O., PARK, S. H; JIANG, H.; GIUS, D. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. **Molecular cell**, v. 40, n. 6, p. 893-904, 2010.

THIMMULAPPA, R. K.; LEE, H.; RANGASAMY, T.; REDDY, S. P., YAMAMOTO, M.; KENSLER, T. W.; BISWAL, S. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 4, p. 984, 2006.

TSAI, C. J.; SUN P. B. Identification of sulfoglycolipid bioactivities and characteristic fatty acids of marine macroalgae. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 34, p. 8404-8410, 2012.

URBANEK, K.; QUAINI, F.; TASCA, G.; TORELLA, D.; CASTALDO, C.; NADALGINARD, B.; ... ANVERSA, P. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, p. 10440-10445, 2003.

VALLE-PRIETO, A.; CONGET, P. A. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. **Stem cells and development**, v. 19, n. 12, p. 1885-1893, 2010.

VAN DEN ELSEN, L. W.; NUSSE, Y.; BALVERS, M.; REDEGELD, F. A.; KNOL, E. F.; GARSSSEN, J.; WILLEMSSEN, L. E. n-3 Long-chain PUFA reduce allergy-related mediator release by human mast cells in vitro via inhibition of reactive oxygen species. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 10, p. 1821-1831, 2013.

VISIOLI, F.; COLOMBO, C.; GALLI, C. Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 245, n. 2, p. 487-489, 1998.

WANG, H.; KHOR, T. O.; SAW, C. L. L.; LIN, W.; WU, T.; HUANG, Y.; KONG, A. N. T. Role of Nrf2 in suppressing LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages by polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid. **Molecular pharmaceutics**, v.7, n.6, p. 2185-2193, 2010.

WRIGHT, S. A.; O'PREY, F. M.; MCHENRY, M. T.; LEAHEY, W. J.; DEVINE, A. B.; DUFFY, E. M.; ... MCVEIGH, G. E. A randomised interventional trial of ω -3-polyunsaturated fatty acids on endothelial function and disease activity in systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, v.67, n. 6, p. 841-848, 2008.

YAMANAKA S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. **Cell stem cell**. v.1, p. 39-49, 2007.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** V. 47, p. 143-183, 2007.

YANG, K. L., CHEN, M. F., LIAO, C. H., PANG, C. Y., & LIN, P. Y. A simple and efficient method for generating Nurr1-positive neuronal stem cells from human wisdom teeth (tNSC) and the potential of tNSC for stroke therapy. **Cytotherapy**, v.11, n.5, p. 606-617, 2009.

YUSTA-BOYO, M. J.; GONZÁLEZ, M. A.; PAVÓN, N.; MARTÍN, A. B.; DE LA FUENTE, R.; GARCÍA-CASTRO, J.;...VICARIO-ABEJÓN, C. Absence of hematopoiesis from transplanted olfactory bulb neural stem cells. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 505-512, 2004.