

TESTES DE COMPOSTOS OXÍMICOS SOBRE A ATIVIDADE “*IN VIVO*” DA METACASPASE YCA1 DE *Saccharomyces cerevisiae*

Laura de Azevedo Maffei Dalzoto¹; Mariana da Palma Valério²; Mauricio Ferreira Marcondes Machado³

1. Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: lauradalzoto@gmail.com
2. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: marianavalerio566@gmail.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: mauriciomachado@umc.br

Área de conhecimento: Biologia Celular

Palavras-chave: Metacaspase; *Saccharomyces cerevisiae*; compostos oxímicos

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos a morte celular foi considerada um processo passivo realizado por organismo pluricelulares a fim de garantir a sobrevivência de células viáveis, com estudos realizados ao longo do tempo descobriu-se que organismos unicelulares são capazes de controlar e induzir a morte celular programada (MCP), determinando o momento preciso em que a célula entrará em processo de morte (CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2018). A morte MCP é definida como todos os tipos de mortes celulares executadas de maneira regulada através de processos moleculares e dentre os tipos de MCP definidos encontra-se a apoptose. A apoptose foi descrita inicialmente em organismos multicelulares (EISENBERG *et al.*, 2010), no entanto hoje já se sabe que as células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* exibem características apoptóticas semelhantes ao que ocorre em organismos pluricelulares (SHRESTHA *et al.*, 2019). Para que a via de apoptose seja desencadeada existem enzimas que garantem o seu funcionamento, tais como as metacaspases. As metacaspases são encontradas em plantas, fungos e protozoários e possuem similaridade estrutural com as caspases encontradas em mamíferos que possuem papel vital nas vias de morte celular, ambas são cisteíno-proteases pertencentes ao clã CD da família C14 (MININA, *et al.*, 2017). O clã envolve proteases dependentes de cisteína (Cys) com uma única dobra nas folhas α e β , que consiste em uma subunidade grande (p20) contendo a díade catalítica de Histidina/Cisteína (Hys/Cys) e a subunidade pequena (p10). Ao contrário do que se observa nas caspases, as metacaspases não carecem do processo de dimerização para estarem ativas, no entanto, sua atividade depende da presença de um cofator, íon cálcio, e diferente das caspases que clivam seu substrato após um resíduo de ácido aspártico, as metacaspases clivam seus substratos após resíduos básicos (arginina e/ou lisina) (VERCAMMEN *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2013). Dentre as metacaspases temos uma subdivisão em tipos baseada nas diferenças estruturais, a metacaspase tipo I contém um prodomínio N-terminal rico em prolina e motivo dedo de zinco, a metacaspase tipo II possui um domínio vinculador com vários resíduos de aminoácidos que separam a subunidade p20 catalítica e p10 reguladora, já a metacaspase tipo III sofre um rearranjo diferente, a subunidade p10 antecede a subunidade p20 encontrando-se localizada no N-terminal (MININA *et al.*, 2017; KLEMENČIČ & FUNK, 2019). A metacaspase do tipo I é encontrada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e recebe o nome de *Yeast Caspase 1* (YCA1). A metacaspase YCA1 está relacionada diretamente a morte celular (apoptose) induzida por estresse oxidativo e senescência celular, estudos demonstraram que a YCA1 regula ativamente o ciclo celular da levedura, atuando precisamente na transição da fase G₁ para a fase S, e quando é inibida a atividade da enzima ou retirado o gene para sua expressão nota-se uma transição de G₁ para S tardia em estudos de comparação entre cepas nocautes ($\Delta yca1$) e selvagens (BY4741) (LEE *et al.*, 2008). Há muitos estudos em torno da regulação bioquímica e fisiológica da metacaspase YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que atualmente essa enzima é a mais amplamente caracterizada entre as metacaspases (SHRESTHA, 2019).

OBJETIVOS

Avaliar o efeito de compostos oxímicos derivados do eugenol sobre a atividade *in vivo* da metacaspase YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae*, através de testes de viabilidade celular.

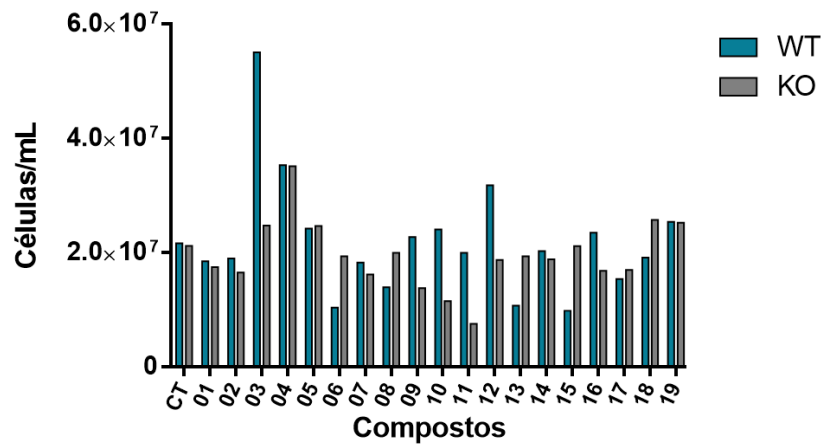
METODOLOGIA

As cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas nesse estudo foram a do tipo selvagem (BY4741) e nocaute do gene da metacaspase ($\Delta yca1$). O meio de cultura utilizado para o cultivo da *S. cerevisiae* foi o meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%) e o meio YPD sólido, que é o meio YPD líquido acrescido de 1% de ágar bacteriológico, preparado em água destilada. O teste de susceptibilidade dos compostos oxímicos foi realizado a partir do pré-inóculo deixado em incubação overnight, onde foi padronizado uma massa celular de 10^7 células/mL para cada cepa, realizado através da leitura da densidade ótica (DO) em um espectrofotômetro em um $\lambda = 660$ nm (DO660), após as células foram tratadas com os respectivos compostos numa concentração de 10 μ M e manteve-se um controle para cada cepa inoculada na ausência dos compostos, posteriormente foram incubadas a 30°C sob agitação orbital constante de 180 rpm em um Shaker termostatizado (Ethik) por 3 h, posteriormente realizou-se uma diluição das células em solução salina 0,9% numa proporção 1:5 célula/solução salina e realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer. O teste de viabilidade celular foi realizado a partir de um pré inóculo, conforme descrito anteriormente, deixou-se incubado overnight e posteriormente foi realizada a leitura da quantidade de células através do espectrofotômetro em um $\lambda = 660$ nm (DO660), realizou-se uma diluição das células para uma DO660 = 0,2 em um volume final de 3mL de meio de cultura (quantidade em cada tubo falcon), para ambas as cepas. Após a determinação da quantidade de células a ser utilizada em cada tubo, as cepas foram submetidas separadamente a presença dos compostos oxímicos em uma concentração de 10 μ M, as células foram incubadas em uma temperatura de 30° C a 160 rpm em um Shaker termostatizado (Ethik), e acompanhou-se a densidade ótica até que o controle de cada cepa em cultura atingisse um DO660 de 0,6, posteriormente realizou-se o teste de viabilidade através da técnica de MTT e leitura da placa em um $\lambda = 570$ (DO570). Todos os dados obtidos foram utilizados para a construção do gráfico no programa GraphPad Prism 6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

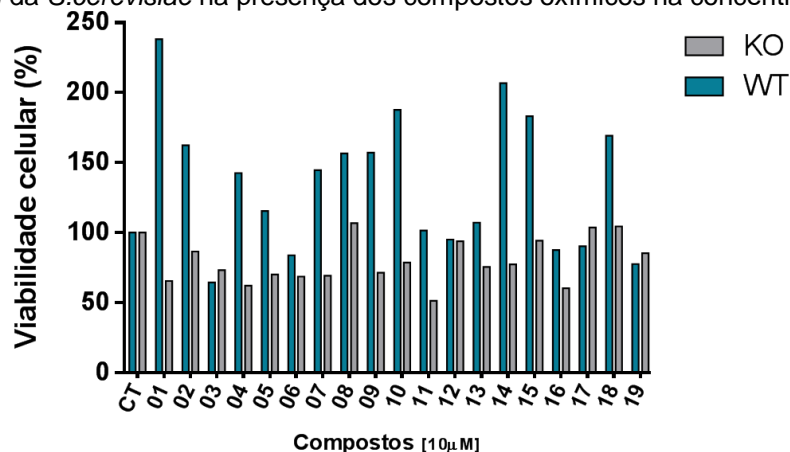
Sabe-se que compostos derivados do eugenol possuem características como mecanismos fungicidas, atividade anti-inflamatória, entre outros que geram um interesse para estudos (CARRASCO *et al.*, 2008), a partir desse pensamento realizamos testes *in vivo* a fim de observar uma possível interação desses com a metacaspase YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Primeiramente realizou-se um teste de susceptibilidade celular onde a cepa selvagem e nocaute para o gene da metacaspase, foram submetidas a presença dos compostos por 3h, isso pois as células necessitam de um tempo para adaptar-se ao meio novo em que se encontram denominado de fase *lag* – quanto mais tóxico o ambiente se encontra mais tempo elas levarão para se adaptar – posteriormente realizamos a contagem do número de células em câmara de Neubauer. Os dados obtidos foram representados no gráfico abaixo (figura 1). Observamos que apesar da cepa nocaute apresentar uma quantidade maior de células na presença de alguns compostos (TB-06, TB-08, TB-13, TB-15 e TB-18) em comparação a cepa selvagem, a mesma manteve-se na faixa de crescimento que a célula nocaute sem a presença dos compostos (CT KO), e em contrapartida houve uma discrepância no crescimento das células selvagens na presença de vários compostos em comparação a célula selvagem sem a presença dos compostos (CT WT), e ainda em comparação a cepa nocaute na presença do mesmo composto teve um crescimento dobrado, como demonstra o composto TB-10.

Figura 1 – Contagem do número de células em câmara de Neubauer cepas selvagens (WT) e nocaute (KO) da *S.cerevisiae* na presença dos compostos oxímicos na concentração de 10 μ M



Posteriormente realizamos o teste de viabilidade celular com as células em fase exponencial através da técnica de MTT, que consiste na avaliação das células viáveis através da intensidade da cor formada pela conversão dos sais de tetrazólio em cristais de formazan que só é possível ser convertido por células metabolicamente ativas, ou seja, quanto mais intenso a cor púrpura formada no fim da reação mais células viáveis estavam presentes (VAN MERLOO, KASPERS & CLOSS, 2011). Os dados obtidos na leitura da placa nesse experimento estão representados em percentuais no gráfico abaixo (figura 2).

Figura 2 – Viabilidade celular realizada pela técnica de MTT utilizando as cepas selvagens (WT) e nocaute (KO) da *S.cerevisiae* na presença dos compostos oxímicos na concentração de 10 μ M



Observamos uma relação dos resultados obtidos nesse ensaio com o comportamento da cepa selvagem na presença dos compostos no experimento anterior, como por exemplo demonstrou-se nos compostos TB-09, TB-10, TB-11, TB-17 e TB-16, onde houve um crescimento extrapolado das células selvagens em relação ao seu controle e as células nocaute, notando ainda que a nocaute como foi descrito para o experimento anterior manteve-se na faixa de crescimento ou abaixo do seu controle. Conseguimos observar a partir os dados apresentados que alguns dos compostos oxímicos derivados do eugenol podem ter uma ação inibitória em torno da metacaspase YCA1, isso pois a cepa selvagem na presença de algumas dessas moléculas apresentou crescimento maior em relação a cepa nocaute, que demonstrou um crescimento normal ou menor comparado ao seu controle. Sabe-se que a metacaspase está envolvida diretamente na regulação celular, como por exemplo na morte celular programada (apoptose), e que como demonstrado por Lee *et al.* (2008) a expressão da YCA1 regula ativamente o ciclo celular, os efeitos desses compostos podem agir inibindo a

metacaspase e levando a uma desregulação no ciclo celular, como nas cepas nocautes não há presença do gene que codifica a metacaspase YCA1 não haverá influência dessa ação inibitória ocasionada pelos compostos sobre o ciclo celular.

CONCLUSÕES

A YCA1 é uma enzima reguladora do ciclo celular na *Saccharomyces cerevisiae*, a partir dos resultados apresentados aqui propomos que os compostos oxímicos derivados do eugenol possuem interação inibitória com essa metacaspase visto que houve um estímulo para crescimento na cepa selvagem que possui o gene da YCA1, e sendo que o mesmo não foi observado na cepa nocaute para o mesmo gene. Porém para confirmar tais resultados são necessários estudos mais aprofundados visando entender a ação e interação desses compostos com a metacaspase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARRASCO A., H.; ESPINOZA C., L.; CARDILE, V.; GALLARDO, C.; CARDONA, W.; LOMBARDO, L.; CATALÁN K., M.; CUELLAR M., F.; RUSSO, A. Eugenol and its Synthetic Analogues Inhibit Cell Growth of Human Cancer Cells (Part I). **J Braz Chem Soc**, São Paulo, v. 19, n. 13, p. 543-548, 2008.

CARMONA-GUTIERREZ, D.; BAUER, M.A.; ZIMMERMANN, A. et al. Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. **Microbial Cell**, Áustria, v. 5, n. 1, p. 4-31, jan/2018.

EISENBERG, T.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; BÜTTNER, S.; TAVERNARAKIS, N.; MADEO, F. Necrosis in yeast. **Apoptosis**, Holanda, v. 15, n. 3, p. 257-268, 2010.

KLEMENČIČ, M.; FUNK, C. Evolution and structural diversity of metacaspases. **Journal of Experimental Botany**, Bélgica, v. 70, n. 7, p. 2039-2047, mar/2019.

LEE, R.E.; PUENTE, L.G.; KAERN, M.; MEGENEY, L.A. A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. **PLoS One**, Estados Unidos, v. 3, n. 8, p. e2956, ago/2008.

MACHADO, M.F.M.; MARCONDES, M.F.; JULIANO, M.A.; MCLUSKEY, K.; MOTTRAM, J.C.; MOSS, C.X.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, V. Substrate specificity and the effect of calcium on *Trypanosoma brucei* metacaspase 2. **FEBS Journal**, Reino Unido, v. 280, n. 11, p. 2608-2621, jun/2013.

MININA, E.A.; COLL, N.S.; TUOMINEN, H.; BOZHKOVA, P.V. Metacaspases versus caspases in development and cell fate regulation. **Cell Death Differ**, Reino Unido, v. 24, n. 8, p. 1314-1325, fev/2017.

SHRESTHA, A.; BRUNETTE, S.; STANFORD, W.L.; MEGENEY, L.A. The metacaspase Yca1 maintains proteostasis through multiple interactions with the ubiquitin system. **Cell Discov**, Reino Unido, v. 5, n. 6, p. 1-13, 2019.

VAN MERLOO, J.; KASPERS, G.J.L.; CLOSS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. **Methods Mol Biol**, Estados Unidos, v. 731, n. 20, p. 237-245, mar/2011.

VERCAMMEN, D.; VAN DE COTTE, B.; DE JAEGER, G. et al. Type II Metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana Cleave Substrates after Arginine and Lysine. **J Biol Chem**, Estados Unidos, v. 279, n. 44, p. 45329-45336, 2004.