

AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VIVO* DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) SOBRE A METACASPASE (YCA1) DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Jaqueline Moreira dos Santos¹; Taiz dos Reis Santos², Edgar Julia Paredes Gamero³; Mauricio Ferreira Marcondes Machado⁴

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: ja.moreira@outlook.com.br
2. Mestranda em Biotecnologia; e-mail: taiz_reis18@hotmail.com
3. Professor UFMS; e-mail: paredes.gamero@gmail.com
4. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: mauriciomachado@umc.br

Área de conhecimento: **Biologia celular**

Palavras-chave: peróxido de hidrogênio; estresse oxidativo; metacaspase e *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

Células perdem viabilidade ao sofrerem danos como hipóxia, exposição a produtos tóxicos e ausência de componentes nutricionais. Ao sofrer injúria pode desenvolver diferentes tipos de morte celular. Em resposta a esses estímulos a morte celular pode ocorrer em minutos ou levar horas para acontecer. Em relação a apoptose sendo classificada como uma morte celular programada (MCP) as principais características morfológicas que uma célula apresenta são a condensação da cromatina, a ruptura do DNA, a transferência da fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática. Para o funcionamento da apoptose existem enzimas essenciais, que são denominadas metacaspase, sendo classificadas em cisteíno-proteases pertencentes ao Clã CD da subfamília C14 (TSIATSIANI *et al.*, 2011). Existem três tipos distintos de metacaspase; a tipo I, tipo II e tipo III, as metacaspases de tipo I possuem um pro-domínio N-terminal contendo uma repetição rica em prolina, já as metacaspases de tipo II não apresentam este pro-domínio, porém possuem uma região de ligação entre as subunidades P₂₀ e P₁₀, já a metacaspase do tipo III a subunidade P₁₀ antecede a subunidade P₂₀ (TSIATSIANI *et al.*, 2011). As metacaspases de tipo I são encontradas em leveduras como na *Saccharomyces cerevisiae* e recebe o nome de YCA1 (do inglês *yeast caspase-1*), fungos e protozoários, enquanto que a metacaspase tipo II são encontradas em plantas (MACHADO *et al.*, 2013; TSIATSIANI *et al.*, 2011). As metacaspases tem uma especificidade de clivagem por proteínas após resíduos básicos de arginina ou lisina. Porém a metacaspase já foi associada as diversas funções na levedura *S. cerevisiae* como regulação do ciclo celular e a morte celular programada (CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2008). Através do metabolismo celular pode ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (JAMIESON, 1998). A formação de ERO pelas mitocôndrias é um evento contínuo e fisiológico sob condições aeróbicas, porém as mesmas possuem sistemas antioxidantes enzimáticos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase. Os sistemas de defesa não enzimáticos consistem em moléculas que são solúveis em ambiente aquoso. Em geral atuam como eliminadores radicais, sendo oxidados por EROs e assim removendo os oxidantes da solução, uma destas defesas é a glutathiona (GSH) (JAMIESON, 1998). Em condições fisiológicas, os sistemas oxidante e antioxidante da organela estão em equilíbrio, mas sob condições em que um excesso de EROs é gerado e/ou o sistema de defesa antioxidante é exaurido, um estado de estresse oxidativo é criado.

OBJETIVO

Estudar o efeito *in vivo* do H₂O₂ sobre a atividade da metacaspase (YCA1) de *Saccharomyces cerevisiae*.

MATERIAIS E MÉTODOS

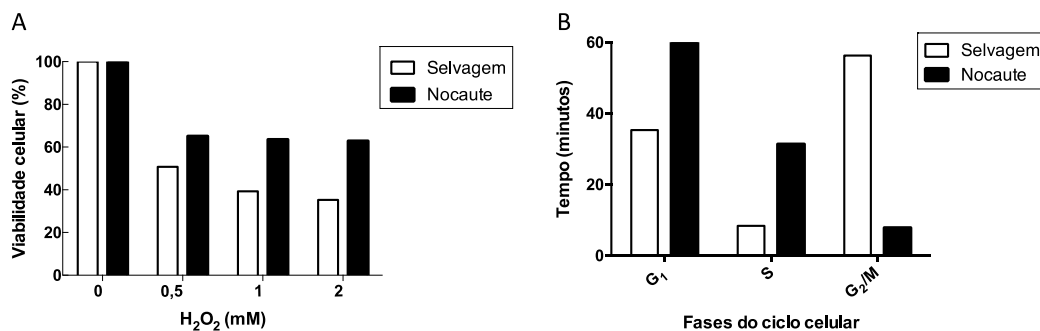
As cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas foram do tipo selvagem (BY4742) e nocaute do gene da metacaspase ($\Delta yca1$). O meio utilizado para o cultivo da levedura foi YPD, constituído por extrato de levedura, peptona e dextrose, e o meio YPD sólido que teve acréscimo de ágar bacteriológico. Para avaliação do efeito do H₂O₂ sobre a levedura foram inoculadas inicialmente as cepas $\Delta yca1$ e BY4742 em 10 mL de meio YPD líquido. A inoculação foi incubada a 30°C sob agitação orbital constante de 180 rotações por minuto (rpm) em um Shaker (Novatécnica) durante 18 horas. Com o pré-inóculo, foi realizada a leitura da densidade óptica (DO) no espectrofotômetro Bio-Rad SmartSpec Plus em um comprimento de onda de 660 nm, a partir dos valores obtidos foi incubado 10⁷ células/mL em 10 mL de YPD, com concentração de H₂O₂ (2 mM), durante 20 horas a 30°C sob agitação de 180 rpm em Shaker. Posteriormente foi realizado a leitura destas amostras da DO no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 660 nanômetros. Dados tratados pelo programa GrandPad Prism.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizamos a avaliação da viabilidade celular das cepas de *S. cerevisiae* em diferentes concentrações de H₂O₂ (0, 0,5, 1 e 2 mM), uma vez que é descrito que o H₂O₂ induz morte das células do tipo selvagem (FARRUGIA e BALZAN, 2012; LEFEVRE *et al.*, 2012), o que foi observado através da porcentagem de células que apresentaram marcação por PI, em contrapartida, as células do tipo nocaute são mais resistentes ao efeito induzido pelo H₂O₂ apresentando uma menor porcentagem de células marcadas com PI (figura 1A). Esses resultados confirmam dados obtidos em outros estudos que demonstram que a deficiência da YCA1 na *S. cerevisiae* provoca uma desregulação das defesas antioxidantes, sugerindo que a YCA1 está envolvida no processo de morte induzido por H₂O₂, porém em concentrações saturantes de H₂O₂ (2 mM) mesmo as cepas nocautes da YCA1 apresentaram uma MCP, sugerindo que outros fatores podem ser alterados nessas condições (FARRUGIA *et al.*, 2012; LEFEVRE *et al.*, 2012).

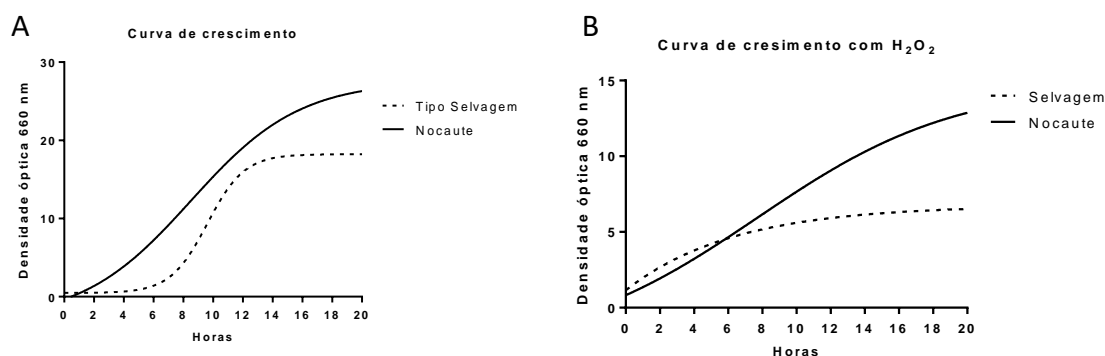
A avaliação do perfil do ciclo celular em condições de carenciamento realizamos a incubação das cepas em meio suplementado (YPD) após um período de carenciamento de 5 horas, com o intuito de avaliar a duração do ciclo celular em condições normais, nossos dados demonstraram um aumento substancial da duração do ciclo celular da cepa nocaute, uma vez que a passagem da fase G₁ para S se tornou mais prolongada, enquanto a passagem de G₂/M é nitidamente mais rápida quando comparado com a cepa selvagem (Figura 1B). Segundo Lee *et al.*, (2008) a YCA1 é capaz de regular o ciclo celular, nossos dados confirmam esse achado demonstrando o envolvimento da YCA1 na regulação do ciclo celular da levedura *S. cerevisiae*, uma vez que sua ausência implica na modulação da passagem de G₁ para S e de S para G₂/M, independente do carenciamento do meio de cultura, diferentemente do que observamos com a cepa selvagem.

Figura 1: (A) Comparação por citometria de fluxo da taxa de sobrevivência das células tratadas com H₂O₂ (0, 0,5, 1 e 2mM respectivamente). (B) Tempo de duração das fases do ciclo celular em meio YPD após 5 horas de carenciamento em NaCl 0.9%.



Observamos que a fase *lag*, ou seja, fase de adaptação celular ao meio na cepa selvagem leva em torno de 6 horas, enquanto que na cepa nocaute não apresenta a fase *lag*. Após esta fase, se inicia a multiplicação celular, a etapa exponencial, a cepa selvagem possui uma fase exponencial de aproximadamente de 8 a 12 horas, diferentemente da cepa nocaute que apresenta constante crescimento, não sendo possível observar o fim da fase exponencial (Figura 2A). Peculiarmente a cepa selvagem não apresentou fase de adaptação celular, apenas um crescimento exponencial que permanece aproximadamente por 6 horas mostrando um decaimento, ou seja, a fase estacionária. A cepa nocaute assim como no gráfico 1, não apresenta fase *lag*, mas somente a fase exponencial, sem cessar durante às 20 horas de incubação. Ambas as cepas não atingem densidade óptica acima de 15, ao contrário do observado na figura 4 onde alcançam densidade óptica acima de 15 (Figura 2B).

Figura 2: (A) Curva de crescimento das cepas selvagem (pontilhado) e nocaute (retilínea), em meio YPD sem troca de meio de cultura e sem H₂O₂ durante 20 horas. (B) Curva de crescimento das cepas selvagem (pontilhado) e nocaute (retilínea), em meio YPD sem troca de meio de cultura durante 20 horas, com 2mM de H₂O₂.



CONCLUSÃO

A apoptose é uma forma de morte celular que leva à remoção de células indesejadas ou danificadas. Com o trabalho e os resultados aqui apresentados foi possível concluir que a enzima metacaspase de levedura, a YCA1, não está relacionada somente com a regulação do ciclo celular em casos de privação nutricional. Mas existe um papel importante desta enzima na regulação da morte celular programada de células inviáveis da *S. cerevisiae*, quando submetidas a ocasião de estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio, ou mesmo envelhecimento celular.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, CNPq e FAEP.

REFERÊNCIAS

CARMONA-GUTIERREZ, D.; REISENBICHLER, A.; HEIMBUCHER, P.; BAUER, M. A.; BRAUN, R. J.; RUCKENSTUHL, C.; BUTTNER, S.; EISENBERG, T.; ROCKENFELLER, P.; FROHLICH, K. U.; KROEMER, G.; MADEO, F. **Ceramide triggers metacaspase-independent mitochondrial cell death in yeast. *Cell Cycle*, v. 10, n. 22, p. 3973-8, Nov 15 2011.**

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. ***Front Oncol*, v. 2, p. 64, 2012.**

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ***Yeast*, v. 14, n. 16, p. 1511-27, Dec 1998.**

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*, v. 3, n. 8, p. e2956, Aug 13 2008.**

LEFEVRE, S.; SLIWA, D.; AUCHERE, F.; BROSSAS, C.; RUCKENSTUHL, C.; BOGGETTO, N.; LESUISSE, E.; MADEO, F.; CAMADRO, J. M.; SANTOS, R. The yeast metacaspase is implicated in oxidative stress response in frataxin-deficient cells. ***FEBS Lett*, v. 586, n. 2, p. 143-8, Jan 20 2012.**

MACHADO, M. F.; 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 J*, v. 280, n. 11, p. 2608-21, Jun 2013.**

TSIATSIANI, L.; VAN BREUSEGEM, F.; GALLOIS, P.; ZAVIALOV, A.; LAM, E.; BOZHKO, P. V. Metacaspases. ***Cell Death Differ*, v. 18, n. 8, p. 1279-88, Aug 2011.**