

AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VIVO* DE ISOLADOS DE PRODUTOS NATURAIS SOBRE A METACASPASE (YCA1) DE *Saccharomyces cerevisiae*

Taíz dos Reis Santos¹; Jaqueline Moreira dos Santos²; Edgar Julian Paredes Gamero³; Maurício Ferreira Marcondes Machado⁴

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

Área de conhecimento: **Bioquímica dos microrganismos**

Palavras chave: ciclo celular; metacaspase; *Raputia praetermissa*; *Saccharomyces cerevisiae*; viabilidade.

INTRODUÇÃO

A manutenção da vida dos organismos se dá por meio de um processo biológico vital, denominado ciclo celular. Sua regulação se dá por meio de proteínas quinases dependentes de ciclinas, que coordenam as atividades metabólicas da célula para que o ciclo celular progrida de forma adequada (ALBERT *et al.*, 2010; LEHNINGER, NELSON e COX, 2014). Estudos sugerem que a morte celular programada depende da ativação de proteases específicas, as chamadas caspases (ALBERT *et al.*, 2010). As metacaspases são cisteíno proteases da família das caspases presentes em eucariotos simples. Estas proteases foram identificadas com base na similaridade estrutural com as caspases, diferindo destas pela sua especificidade por substrato e seu mecanismo de ativação. As metacaspases apresentam afinidade por resíduos básicos de aminoácidos arginina ou lisina, enquanto as caspases possuem afinidade por resíduos de ácido aspártico (TSIATSIANI *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2013). Além do mais, as metacaspases são proteínas monoméricas e são ativadas na presença do íon cálcio (MACHADO *et al.*, 2013). Tem sido demonstrado o envolvimento da metacaspase YCA1 no processo de morte celular programada e controle do ciclo celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No presente avaliamos o efeito *in vivo* da YCA1 sobre a regulação da curva de crescimento da *S. cerevisiae* selvagem e nocaute para a YCA1 e avaliamos efeito de compostos extraídos da planta *Raputia praetermissa* sobre a viabilidade celular das estirpes selvagem (BY4742) e nocaute para a metacaspase ($\Delta yca1$) de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da YCA1 sobre o crescimento da *S. cerevisiae*.
- Realizar a triagem de compostos isolados de *R. Praetermissa* sobre a viabilidade celular da *S. cerevisiae*.

METODOLOGIA

O cultivo das estirpes (nocaute e selvagem) foi realizado em meio YPD, a partir do pré inóculo, repicamos 10^4 células/mL em meio YPD líquido inoculado a 30°C sob agitação orbital constante de 180 rpm em um Shaker termostatizado. O crescimento celular foi acompanhado

através da leitura da densidade ótica a 660_{nm} (DO_{660nm}) durante 72 horas em espectrofotômetro em intervalos de 3 horas.

A levedura foi submetida a duas condições de crescimento distintas, expostas abaixo:

- Em **batelada** onde o meio de cultura foi trocado a cada 12 horas.
- Em **fluxo contínuo** onde não houve a troca do meio de cultura durante as 72 horas de incubação.

Após estabelecimento da curva de crescimento, realizou-se o teste de susceptibilidade dos compostos relacionados na Tabela 1.

Tabela 1: Compostos isolados da planta *Raputia praetermissa*

Compostos	Código
Evolítrina	C1
Diterpeno clerodano	C2
Cicloartenona	C3
Raputimonoidol A	C4
4-desoxi-raputindol C	C5
11b,19a-diidroxi-7-deoxo-7-acetoxi-ichangina	C6
Raputimonoidol C	C7
N-metil-4-metoxi-2-quinolona	C8
Robustina	C9

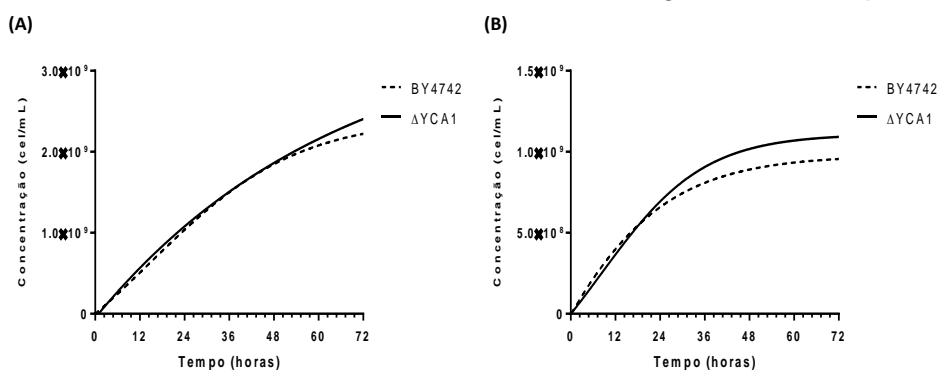
Realizamos a partir do pré-inóculo foram repicadas 10⁴ células/mL tratadas com 100 µM dos respectivos compostos (Tabela 1) e foram incubadas a 30°C sob agitação orbital constante de 180 rpm em um Shaker termostatizado durante 24h. Realizamos a leitura em um citômetro de fluxo marcado com 5µg/mL de iodeto de propídio (PI) durante 1 hora a 37°C em agitação de 180 rpm em um Thermo-Shaker. A citometria de fluxo foi realizada com um total de 10.000, avaliados em um comprimento de onda de excitação de $\lambda_{ex} = 488\text{nm}$ e de emissão com a emissão de $\lambda_{em} = 585/40\text{ nm}$, com os dados obtidos avaliamos a porcentagem de células viáveis das cepas BY4742 e ΔYCA1 frente aos diferentes compostos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A YCA1 está envolvida no processo de regulação celular, no entanto o seu mecanismo sobre esse processo ainda não foi bem elucidado (LEE *et al.*, 2010). A inativação da metacaspase altera a duração do ciclo celular, além de atuar como regulador positivo da morte celular programada (MCP) (TSIATSANI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2010). Nossos resultados demonstram que em ambiente com pouca disponibilidade de nutrientes e alteração na composição do mesmo devido a formação de ácidos orgânicos com consequente alteração do ambiente de crescimento, constatamos que o controle do ciclo celular é dependente da YCA1, uma vez que sua inativação alterou o tempo do ciclo celular, demonstrado pela diferença do tempo em que a cepa selvagem (BY4742) levou para chegar na fase estacionária

comparado a nocaute ($\Delta YCA1$) em ambas condições de crescimento (batelada e fluxo contínuo) (Figura 1).

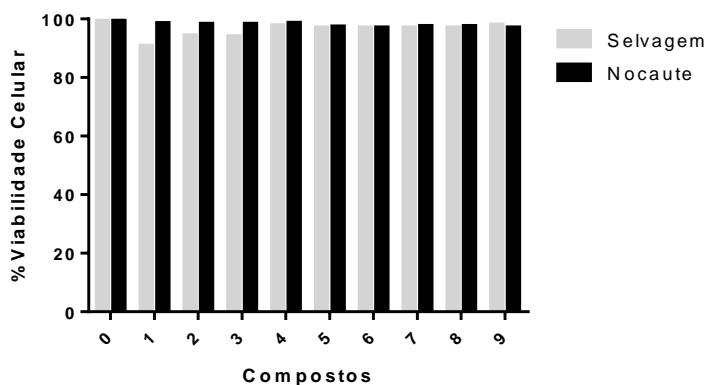
Figura 01: Curva de crescimento da *S. cerevisiae* selvagem e mutante para YCA1.



Avaliação da curva de crescimento da levedura *S.cerevisiae* selvagem (linha pontilhada) e nocaute para YCA1 (linha contínua) em duas condições de ensaio (A) Batelada, o meio de cultura foi trocado a cada 12 horas e (B) Fluxo contínuo, sem a troca de meio de cultura.

Realizamos a triagem com os compostos com ambas as cepas (nocaute e selvagem), onde observamos pouca ou nenhuma alteração na viabilidade celular da *S. cerevisiae* frente a esses compostos, uma vez que observamos uma porcentagem mínima de células marcadas com PI. Os resultados de fluorescência, obtidos no teste com o PI com células *S. cerevisiae* tratadas com os compostos isoladas de *Raputia praetermisssa*, demonstraram que não houve ativação das vias de morte na presença ou ausência da YCA1. Nenhuma das concentrações de tratamento apresentaram viabilidade celular inferior a 90%, demonstrando assim, que este composto não foi citotóxico para as cepas selvagem e nocaute de *S.cerevisiae*, nestas condições de tratamento. Já que apenas a viabilidade celular inferior a 80% é considerada citotóxica. Isso sugere, que não houve ativação das vias de morte celular na presença e na ausência da YCA1, nas condições testadas (Figura 2). Nosso grupo já observou o envolvimento da YCA1 na modulação do ciclo celular, sendo seu maior envolvimento na regulação do Início e na passagem de G_1 para a fase S. Além disso observamos que ausência da YCA1 interfere em outros pontos de seguimento do ciclo celular, alterando desta forma a passagem da fase S para G_2/M na cepa nocaute, diferente do que observamos com a cepa selvagem.

Figura 2: Triagem dos compostos isolados de *Raputia praetermisssa* na *S.cerevisiae*.



Triagem dos compostos isolados de *R.praetermisssa* na concentração de 100 μ M sobre a viabilidade celular da *S.cerevisiae* selvagem (cinza) e nocaute para YCA1 (preto).

CONCLUSÕES

Demonstramos no presente estudo o envolvimento da YCA1 na regulação e modulação do ciclo celular da levedura *S. cerevisiae*. Onde sua ausência indica a participação da YCA1 na modulação do Início alterando a transição das fases do ciclo celular. Por fim avaliamos a susceptibilidade a morte da cepa selvagem e nocaute de metacaspase frente aos compostos derivados da *Raputia praetermisa*, que não apresentaram nenhuma ação na viabilidade celular da levedura, tanto na cepa selvagem quanto na cepa nocaute da YCA1.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; R, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.

LEE, R. E.; BRUNETTE, S.; PUENTE, L. G.; MEGENEY, L. A. Metacaspase Yca1 is required for clearance of insoluble protein aggregates. **PNAS**, EUA, v. 107, n. 30, p. 13348-53, Julho 2010.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Sarvier, 2014.

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. **The FEBS Journal**, Europa, v. 280, n. 11, p. 2608-1621, Janeiro 2013.

TSIATSIANI, L.; BREUSEGEM, F. V.; GALLOIS, P.; ZAVIALOV, A.; LAM, E.; BOZHKOV, P. V. Metacaspases. **Cell Death and Differentiation**, Roma, v. 18, n. 8, p. 1279-1288, Abril 2011.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, CNPq e FAEP.