

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) SOBRE A METACASPASE YCA1 NO CRESCIMENTO DA *Saccharomyces cerevisiae*

Jaqueline Moreira dos Santos¹; Taiz Souza dos Reis²; Laura de Azevedo Maffei Dalzoto³;
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. Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: lauradalzoto@gmail.com
4. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: mauriciomachado@umc.br

Áreas de conhecimento: **Biologia Celular**

Palavras-chaves: Peróxido de hidrogênio; estresse oxidativo; metacaspase

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) sobre o crescimento da levedura *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 a avaliação das diferentes concentrações de glicose sobre o crescimento da 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 10^7 células/mL em 10 mL de YPD, com diferentes concentrações de glicose (0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 %) durante 72 horas a 30°C sob agitação de 180 rpm em Shaker, no sistema batelada e contínuo. 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. Foi realizado curva de crescimento com 2,0% de glicose com adição de 2 mM de H_2O_2 para avaliação do estresse oxidativo na célula de levedura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizamos a avaliação do crescimento celular das cepas de *S. cerevisiae* em diferentes concentrações de glicose (0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 %), para a análise do crescimento e avaliarmos as diferenças entre as cepas selvagem e nocaute. Estudos demonstram que a melhor caracterização de crescimento em suspensão de *S. cerevisiae* é o que ocorre segundo o crescimento em meio contendo glicose (ELLEDDGE, 1996). Então para verificarmos o papel da YCA1 no controle do crescimento celular desta levedura, realizamos uma curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* utilizando uma cepa selvagem (BY4742) e uma cepa nocaute para o gene da YCA1 ($\Delta yca1$) em meio de cultura YPD em diferentes concentrações de glicose como apresentados nas Figuras 1A e B em sistema batelada (com renovação de glicose a cada 12 horas).

Figura 1 - Curva de crescimento com diferentes concentrações de glicose (0,1%; 0,5%; 1%; 2% e 3%) para a (A) cepa selvagem (BY4742 (sistema batelada) e (B) cepa nocaute.

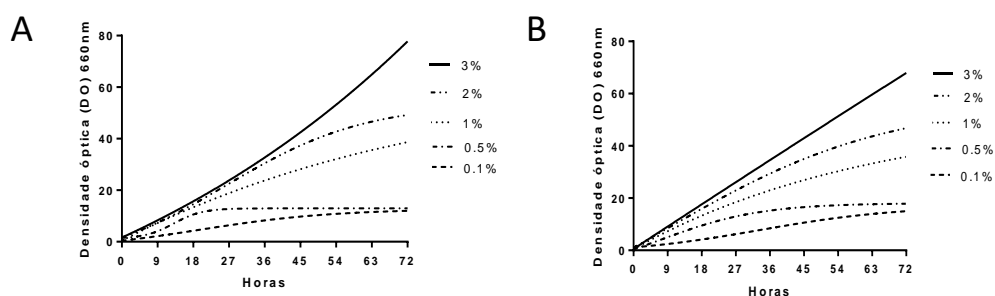
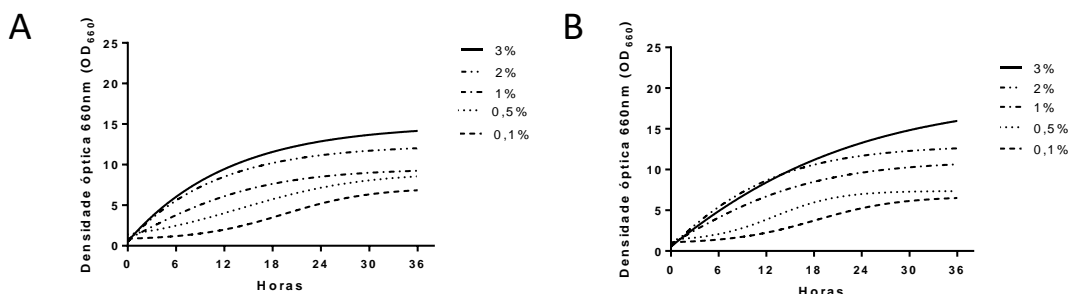
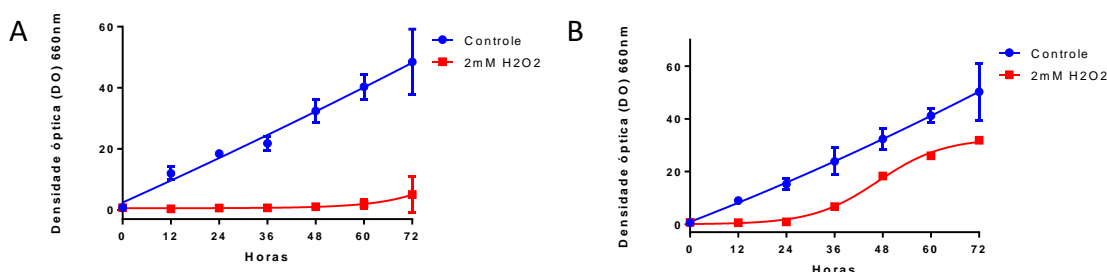


Figura 2 - Curva de crescimento com diferentes concentrações de glicose (0,1%; 0,5%; 1%; 2% e 3%) para a (A) cepa selvagem (BY4742) sem renovação de glicose (sistema contínuo) e (B) cepa nocaute.



O objetivo do ensaio foi avaliar a influência da glicose no crescimento da levedura, juntamente com a ausência e a presença do gene da metacaspase. Observamos que independente da cepa, não houve mudanças bruscas no crescimento, isso sugere que apesar desta protease estar envolvida no crescimento celular, a qual vem a regular o ciclo celular da levedura, conforme já descrito na literatura, esta aparentemente não está envolvida na regulação metabólica da via glicolítica da levedura (FRANCOIS *et al.*, 1987). Foi realizado novamente este ensaio da curva de crescimento em sistema batelada, sendo assim retirando o fator de escassez de nutrientes, para obter resultados na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) avaliando o fator estresse oxidativo na levedura.

Figura 3 - Curva de crescimento da cepa selvagem e nocaute em meio YPD (2% glicose) com 2 mM de H₂O₂ em sistema batelada. (A) Curva de crescimento da cepa selvagem. (B) Curva de crescimento da cepa nocaute.



É descrito que dependendo da concentração as ERO podem estimular diferentes respostas da célula da levedura. Em baixas concentrações ocorre a adaptação celular, e neste momento a célula adquire certa resistência a danos causados por ERRO. Conforme ocorre o aumento da concentração das ERO, a célula mantém sua capacidade redox através da homeostase, que equilibra os níveis de ERO produzidas por organelas ou mecanismos exógenos com consequentemente atraso no ciclo celular (PERRONE, TAN-SHI e DAWES, 2008).

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.

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.

ELLEDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1664-72, Dez 6 1996.

FRANCOIS, J.; ERASO, P.; GANCEDO, C. Changes in the concentration of cAMP, fructose 2,6-bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. **Eur J Biochem**, v. 164, n. 2, p. 369-73, Apr 15 1987.

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.

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.

PERRONE, G. G.; TAN-SHI, X.; DAWES, I. W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, EUA, v. 1783, n. 7, p. 1354-1368, 2008.

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