



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Efeitos da expressão do HIF-1 humano na levedura

Saccharomyces cerevisiae.

NESTOR FABIAN LEYTON CASTRO

BRASÍLIA

2014

NESTOR FABIAN LEYTON CASTRO

Efeitos da expressão do HIF-1 humano na levedura

Saccharomyces cerevisiae.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular- Linha de pesquisa em Biologia Molecular pelo programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília

Orientadora: Ph. D. Élide Geralda Campos

Co-orientador: Ph. D. Túlio César Ferreira

BRASÍLIA

2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Élide Geralda Campos
(Orientadora – IB/ UnB)

Prof. Dr. Túlio César Ferreira
(Co-orientador – IB/UnB)

Prof. Dr. Alexis Fonseca Welker
(IB – UnB)

Prof. Dra. Vera Perussi Polez
(Embrapa)

Aos meus queridos pais e ao meu irmão, por seu apoio incondicional ainda que distante, e por me fazer querer ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Dora E. Castro e Carlos A. Leyton por seu amor incondicional, pelo apoio constante, por estarem presentes nos momentos bons e ruins, por me darem força para que eu deixasse tudo para perseguir meus sonhos e por me ajudarem a alcançá-los.

Á meu irmão David J. Leyton, por seu amor e compreensão, por me impulsionar a ser melhor cada dia, pelos risos e conversas, pela força nas horas difíceis e pela amizade eterna.

Á toda a minha grande família, por todos os anos de apoio e preocupação e pela sua ajuda entregue incondicionalmente.

Á professora Ph. D. Elida G. Campos por me receber no seu grupo de pesquisa e me permitir aprender tantas coisas novas; pela amizade, paciência e compreensão, pelos ensinamentos e conselhos, por seus aportes no desenvolvimento desta pesquisa. Muito obrigado.

Ao professor Ph. D. Tulio C. Ferreira por me acolher no grupo de pesquisa, pela amizade e pelos ensinamentos e aportes no desenvolvimento desta pesquisa.

Á minha namorada Graziela Mendes Medeiros pelo seu amor e apoio, por me suportar neste tempo, pelos risos e cuidados; e á sua família por seu carinho e apoio na consecução desta meta.

Ao meu amigo Juan F. Riasco pela sua amizade sincera ao longo de todos esses anos, pelos risos e conversas, pela força nos momentos ruins e por compartilhar os bons, por ser mais que um amigo, um irmão que a vida me deu.

Aos meus amigos queridos, Miguel Guevara, Karen Robles, Johan Caicedo, por sua amizade sincera nesses anos, pelos conselhos e pelo carinho, pelos risos e cuidados, por me apoiar nessa grande aventura.

Ao grupo de pesquisa em Estresse Oxidativo da Universidade de Brasília, por me permitir trabalhar em seu laboratório, e aos meus companheiros e amigos, Layane Crisostomo, Viviane Vieira de Souza, Carlos E. Cardoso, Walyson Velasco, Raphael Fagundes, Artur Rego, pelas conversas sobre ciência e pelos seus aportes no desenvolvimento desta pesquisa, por sua amizade, compreensão e carinho.

Ao grupo de pesquisa de Radicais Livres do Prof. Marcelo Hermes, especialmente ao Msc. Daniel C. Moreira e à Ph. D. Luana Dalvi, por seus aportes metodológicos durante a realização desta pesquisa, por serem muito prestativos e pela amizade.

À Marciano Regis, Rafael Burtet e Thompson Tomatieli, pelas brincadeiras e pela amizade.

À Dona Fátima, Dona Ivonildes e Ivone (técnicas dos laboratórios) pelo apoio a minha pesquisa, pelos risos e o carinho.

A Universidade de Brasília por ter me acolhido durante este tempo e por me permitir avançar na minha carreira de cientista.

A CAPES pela concessão de bolsa de pesquisa.

Também agradeço a todas as pessoas que de alguma forma ajudaram na consecução e realização deste grande sonho.

Resumo

A hipóxia ocorre quando as células são expostas a baixas tensões (< 5%) de oxigênio. Isto afeta o metabolismo, a expressão de genes, a secreção e resposta a hormônios e pode garantir a sobrevivência ou algumas vezes iniciar uma cascata apoptótica. O fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1) humano regula a transcrição de inúmeros genes envolvidos na resposta à hipóxia e tem importante papel em processos fisiológicos e patológicos. Ele é um heterodímero formado pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β , também chamada de transportador nuclear de arilhidrocarbono (ARNT). Em condições de normóxia, o HIF-1 é hidroxilado pelas prolinhidroxilases (PHDs) e marcado para degradação pelo proteasoma. Porém, quando as células se encontram sob hipóxia, as PHDs são inibidas e assim ocorre o acúmulo do HIF-1 α . Alterações no estado redox podem ter efeito na ativação do HIF-1 e foi verificado que condições de estresse oxidativo podem levar à ativação deste fator. O estresse oxidativo ocorre quando as moléculas antioxidantes e os mecanismos de defesa celular são incapazes de proteger a célula dos efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs) as quais atacam moléculas biológicas vitais, tais como lipídeos, DNA dentre outras. As EROs incluem os radicais livres derivados de oxigênio, entre essas o íon superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila (•OH), e outras moléculas que embora não possuam elétrons livres são muito reativas devido à sua instabilidade, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para estudar os efeitos do HIF-1 sob condições de estresse oxidativo, escolhemos a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como levedura de padeiro. A utilização da levedura *S. cerevisiae* tem provado ser muito útil como um modelo de sistema *in vivo* para estudar a ação de fármacos, a expressão de proteínas heterólogas e a função básica de fatores de transcrição humanos. Foram usadas três linhagens mutantes, EG103 $\alpha\beta$ a qual expressa as duas subunidades do fator de transcrição HIF-1, EG103 $\alpha\Delta\beta$ que expressa a subunidade beta truncada e a linhagem EG103M2 que possui o vetor vazio. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta ao estresse oxidativo dessas linhagens de leveduras para aprofundar o conhecimento sobre a regulação da atividade de HIF-1. O crescimento das linhagens foi investigado e os resultados mostraram que a linhagem EG103 $\alpha\beta$ teve um crescimento menor que as outras duas linhagens (EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M2) em normóxia. Quando tratada com várias concentrações de H₂O₂ o crescimento da linhagem EG103 $\alpha\beta$ diferiu do controle não tratado somente nas concentrações de 1 e 2 mM, quando houve uma diminuição do crescimento. Essa resposta foi similar àquela das outras duas linhagens. Então não foi uma resposta específica da linhagem EG103 $\alpha\beta$, indicando que a expressão do HIF-1 não alterou a sensibilidade da resposta ao H₂O₂. Ao tratar as células com alguns agentes oxidantes como Menadiona (MD), hidroperóxido de cumene (CHP) e terc-butilhidroperóxido (t-BHP) os resultados mostraram que a linhagem EG103 $\alpha\beta$ apresentava uma susceptibilidade menor à MD na concentração 50 μ M, em comparação com as outras linhagens. O uso do inibidor da catalase ATZ (10 mM) e H₂O₂ 0,5 mM mostrou que a susceptibilidade da linhagem EG103 $\alpha\beta$ aumentou em relação ao controle tratado somente com H₂O₂. Nas duas outras linhagens o aumento da susceptibilidade ocorreu com uma concentração menor de ATZ (2 mM) e H₂O₂ 0,5 mM. Isto indica que talvez a linhagem EG103 $\alpha\beta$ tenha maiores concentrações de catalase em relação às outras duas linhagens. O uso do inibidor da síntese de glutatona, butionina-sulfoximina (BSO) não mostrou uma resposta diferenciada da linhagem EG103 $\alpha\Delta\beta$ à exposição ao H₂O₂. O uso do quelante de ferro, deferoxamina (DFO) também mostrou uma ação de proteção contra o dano oxidativo na linhagem EG103 $\alpha\beta$, indicando um papel da ausência de ferro na proteção pelo HIF-1. Medidas dos níveis de glutatona (GSH-eq) e da enzima superóxido dismutase devem ser repetidas para conclusão definitiva de seu papel na linhagem EG103 $\alpha\beta$. Em conclusão, os resultados indicam que a expressão das subunidades que compõem o HIF-1 humano em leveduras reduz seu crescimento, aumenta sua resistência

à menadiona e talvez os níveis de catalase e faz com que um quelante de ferro tenha papel protetor nestas células.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio (EROs), estresse oxidativo, hipóxia, HIF-1 antioxidantes, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Hypoxia occurs when cells are exposed to low oxygen tensions (<5%). It affects the metabolism, gene expression, secretion and response to hormones and can ensure the survival or sometimes initiate an apoptotic cascade. The human hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) regulates the transcription of numerous genes involved in the response to hypoxia and plays an important role in physiological and pathological processes. HIF-1 is a heterodimer formed by the HIF-1 α and HIF-1 β subunits, the latter also called arylhydrocarbone nuclear transporter (ARNT). In normoxic conditions, HIF-1 is hydroxylated by prolylhydroxylases (PHDs) and marked for degradation by the proteasome. However, when cells are under hypoxia, the PHDs are inhibited and HIF-1 α accumulates. Changes in the redox state may have an effect on HIF-1 activation and oxidative stress conditions have been to lead to the activation of this factor. Oxidative stress occurs when the antioxidant molecules and cellular defense mechanisms are unable to protect the cell from the effects of reactive oxygen species (ROS) which attack vital biological molecules such as lipids, DNA and others. ROS include free radicals derived from oxygen, among these the superoxide ion (O₂^{•-}), o hydroxyl radical (•OH), and other molecules that although not having free electrons are very reactive due to its instability, such as hydrogen peroxide (H₂O₂). To study the effects of HIF-1 under conditions of oxidative stress, we chose the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, also known as Baker's yeast. The use of *S. cerevisiae* has proven to be very useful as an in vivo model system to study the action of drugs, the expression of heterologous proteins and the basic function of human transcription factors. The three mutant strains, EG103 $\alpha\beta$ which expresses the two subunits of HIF-1 transcription factor, EG103 $\alpha\Delta\beta$, expressing the truncated beta subunit and EG103M2 strain that possesses an empty vector were used. The objective of this study was to evaluate the oxidative stress response of the yeast strains to increase knowledge about the regulation of HIF-1 activity. The growth of the strains was investigated and the results showed that the strain EG103 $\alpha\beta$ had a slower growth than the other two strains (EG103 $\alpha\Delta\beta$ and EG103M2) under normoxia. When treated with various concentrations of H₂O₂ the growth of EG103 $\alpha\beta$ differed from the untreated control only at concentrations of 1 and 2 mM, when there was a decline in growth. This response was similar to that of the other two strains. So it was not a specific response of EG103 $\alpha\beta$, indicating that HIF-1 expression did not change the sensitivity response to H₂O₂. By treating the cells with certain oxidizing agents such as Menadione (MD), cumene hydroperoxide (CHP) and tert-butylhydroperoxide (t-BHP) the results showed that the strain EG103 $\alpha\beta$ has lower susceptibility to 50 μ M MD concentrations, compared to the other strains. The use of the catalase inhibitor ATZ (10 mM) and 0.5 mM H₂O₂ showed that the susceptibility of EG103 $\alpha\beta$ increased compared to the control treatment only with H₂O₂. In the other two strains increased susceptibility was observed with a smaller concentration of ATZ (2 mM) and 0.5 mM H₂O₂. This indicates that EG103 $\alpha\beta$ has higher catalase levels in comparison to the other two strains. The use of the inhibitor of glutathione synthesis, buthionine sulfoximine (BSO) showed that EG103 $\alpha\Delta\beta$ responded similarly to the other two strains. The use of the iron chelator, deferoxamine (DFO) showed a protective effect against oxidative damage in EG103 $\alpha\beta$, indicating a role of iron absence in the protection by HIF-1. Measures of glutathione levels (GSH-eq) and superoxide dismutase should be repeated for definitive conclusion of their role in the EG103 $\alpha\beta$ lineage. In conclusion, the results indicate that the expression of the subunits that make up the human HIF-1 reduces yeast growth, increases its resistance to menadione and perhaps levels of catalase and makes an iron chelator a protective agent in these cells.

Keywords: Reactive oxygen species, oxidative stress, hypoxia, HIF-1, antioxidants, *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	FATORES DE TRANSCRIÇÃO	23
2.1.1	Fator Induzível por Hipóxia-1 (HIF-1)	25
2.1.2	Regulação do HIF-1	28
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO	30
2.2.1	Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	31
2.2.2	Agentes Oxidantes.....	33
2.2.3	Agentes Inibidores.....	37
2.3	SISTEMAS ANTIOXIDANTES	40
2.3.1	Glutathione (GSH)	41
2.3.2	Superóxido Dismutase (SOD).....	43
2.4	ESTUDOS EM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
2.4.1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> usadas neste estudo.....	48
3.	OBJETIVOS	49
3.1	Objetivo geral.....	49
3.1.1	Objetivos específicos	49
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	REAGENTES	50
4.2	LINHAGENS DE LEVEDURAS.....	50
4.3	Curva de crescimento das linhagens de levedura sob condições de normóxia...52	
4.4	Curva de crescimento das linhagens de levedura sob condições de estresse oxidativo.	52
4.5	Medições da atividade de SOD	53
4.5.1	Exposição de células ao Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	53
4.5.2	Preparo do extrato proteico para medir a atividade de SOD.....	54

4.5.3 Medição da atividade de SOD em microplaca.	54
4.6 Exposição das células de levedura a agentes estressantes em microplaca.	55
4.7 Exposição das células de levedura a H ₂ O ₂ e inibidores em microplaca.	56
4.8 Medida dos níveis de Glutathione.	57
4.8.1 Preparo do extrato proteico para medir a atividade de Glutathione total (GSH-eq) e oxidada (GSSG).	57
4.8.2 Medição de Glutathione total (GSH-eq) e oxidada (GSSG).	57
4.9 Proteínas solúveis totais	59
4.10 Análise estatística.	60
5. RESULTADOS	61
5.1 Crescimento das linhagens de levedura em normóxia.	61
5.2 Análise do crescimento das linhagens de levedura em meio seletivo SCL ⁻ T ⁻ na presença de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).	62
5.3 Crescimento em microplaca das linhagens de levedura em meio seletivo SCL ⁻ T ⁻ na presença de agentes oxidantes.	65
5.4 Crescimento em microplaca das linhagens de levedura em meio seletivo SCL ⁻ T ⁻ na presença de distintos inibidores.	66
5.5 Medida da Glutathione total (GSH-eq), reduzida (GSH) e dissulfeto (GSSG). ...	70
5.6 Medição da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em microplaca.	72
6. DISCUSSÃO	74
6.1 Crescimento das linhagens de levedura em normóxia.	74
6.2 Curva de crescimento das linhagens de levedura em meio seletivo SCL ⁻ T ⁻ na presença de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).	75
6.3. Crescimento em microplaca das linhagens de levedura em meio seletivo SCL ⁻ T ⁻ na presença de agentes oxidantes.	77
6.4 Crescimento em microplaca das linhagens de levedura em meio seletivo SCL ⁻ T ⁻ na presença de distintos inibidores.	79
6.5 Medida da Glutathione total (GSH-eq), reduzida (GSH) e dissulfeto (GSSG). ...	81
6.6. Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em microplaca.	82

7. CONCLUSÕES	84
8. BIBLIOGRAFIA	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Montagem dos complexos de iniciação da transcrição.....	24
Figura 2. Representação esquemática do HIF-1 α e HIF-1 β humano.....	27
Figura 3. Mecanismo de regulação da expressão gênica do HIF-1.....	29
Figura 4. Formação de EROs na cadeia de transporte de elétrons (ETC) mitocondrial.....	32
Figura 5. Estrutura química dos agentes estressores usados neste estudo.....	37
Figura 6. Estrutura química dos agentes inibidores usados neste estudo.....	40
Figura 7. Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR).....	42
Figura 8. Resumo esquemático de parte do sistema antioxidante.....	44
Figura 9. Reação entre glutathiona reduzida e DTNB (reagente de Ellman).....	58
Figura 10. Curva de crescimento das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , EG103M2, EG103 $\alpha\beta$ e EG103 $\alpha\Delta\beta$ sob condições de normóxia.....	62
Figura 11. Curva de crescimento das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> EG103WT (A), EG103M2 (B), EG103 $\alpha\beta$ (C) e EG103 $\alpha\Delta\beta$ (D) na presença H ₂ O ₂	63
Figura 12. Porcentagem de crescimento das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> EG103WT, EG103M2, EG103 $\alpha\beta$ e EG103 $\alpha\Delta\beta$ na presença de H ₂ O ₂	64
Figura 13. Crescimento das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M ₂ na presença de agentes estressores.....	66
Figura 14. Crescimento das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M ₂ sob condições de estresse oxidativo + 3-Amino-1,2,4-triazole (ATZ).....	67
Figura 15. Crescimento das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M ₂ sob condições de estresse oxidativo e DL-Buthionine-sulfoximine (BSO).....	68
Figura 16. Crescimento das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M ₂ sob condições de estresse oxidativo e na presença de Deferoxamina (DFO).....	69

Figura 17. Crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M₂ sob condições de estresse oxidativo na presença do Inibidor de proteasoma (Z-LLF-CHO)..... 70

Figura 18. Concentrações de glutathiona total (GSH-eq) (A) e de glutathiona dissulfeto (GSSG) (B) em extratos das linhagens de leveduras EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M₂ tratadas com H₂O₂ 71

Figura 19. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) (A) e razão entre os conteúdos de glutathiona dissulfeto e glutathiona total (GSSG/GSH-eq) (B).. 71

Figura 20. Porcentagens de glutathiona reduzida (GSH) (A) e glutathiona dissulfeto (GSSG) (B) em relação á glutathiona total (GSH-eq). 72

LISTA DE TABLAS

Tabela 1. Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	31
Tabela 2. Linhagens de leveduras usadas neste estudo.	51
Tabela 3. Vetores obtidos após subclonagem das subunidades do HIF-1 nos vetores de expressão de <i>S. cerevisiae</i>	51
Tabela 4. Curva padrão do ensaio de Bradford	60
Tabela 5. Equivalentes de unidades (U) de SOD nas linhagens de leveduras tratadas ou não com H ₂ O ₂ . Os dados estão expressos em U*. Os dados mostrados são médias de dois experimentos.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

(NH₄)₂ SO₄: Sulfato de amônio

(p/v): peso/volume

•OH: Radical hidroxil

°C: Graus Celsius

μL: Microlitro

μM: Micromolar

AKT: proteína quinase B

ALS: Esclerose lateral amiotrófica

ARD1: Acetiltransferase chamada de *arrest-defective 1*

ARNT: Transportador nuclear de aril hidrocarbono

ATP: Adenosina Trifosfato

ATZ: 3-amino 1,2,4-triazole, Aminotriazol

bHLH: Domínio básico-hélice-loop-hélice

BSA: Albumina de soro bovino

BSO: L-Butionina-S, R-Sulfoximina

BTA: Aparato basal de transcrição

BTF: Fator de transcrição basal

CAT: Catalase

CBP: Proteína ligante ao CREB

CHP: Hidroperóxido de cumene

CITED2: Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2

CITED4: Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 4

COX-2: Ciclo-oxigenase-2

Cu, Zn-SOD= SOD1: Superoxido dismutase com centro catalítico de Cu-Zn

C-TAD: Domínio de transativação – extremidade carboxi-terminal

DFO: Deferoxamina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxiribonucleotídeo

DTNB: Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), Reagente de Ellman

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF: Fator de crescimento epidérmico

EPO: Eritropoietina

ERKs: Quinases reguladas por sinais extracelulares
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativas de oxigênio
ETC: Cadeia de transporte de elétrons
FIH-1: Fator inibidor de HIF-1
Flt-1/VEGF-R1: Receptor do VEGF
FOXO4: Forkhead Box O4
FSH: Hormônio folículo estimulante
GPx: Glutaciona peroxidase
GR: Glutaciona redutase
GRAS: Geralmente reconhecido como seguro
GSH: Glutaciona reduzida
GSH-eq: Glutaciona total
GSSG: Glutaciona dissulfeto
GST: Glutaciona-S-transferase
GSTF: Fator de transcrição de genes específicos
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HGF: fator de crescimento de hepatócitos
HIF-1: Fator induzível por hipóxia -1
HIF-1 α : Subunidade alfa do HIF-1
HIF-1 β : Subunidade beta do HIF-1
HRE: Elemento responsivo a hipóxia
Hsp90: Proteína de choque térmico 90
ID: Domínio inibitório do HIF-1 α
IGF1 e 2: Fator 1/Fator 2 de crescimento de insulina
IMS: Espaço intermembranar mitocondrial
KCN: Cianeto de potássio
LAH: Hidroperóxido do ácido linoleico
M: Molar
MAPK : Proteína quinase ativada
MD: Menadiona
MEK: Quinases ativadoras de MAP-ERK
mg: Miligrama
mL: Mililitro

mM: Milimolar

mmHg: Milímetros de mercúrio

MnSOD= SOD2: Superóxido dismutase com centro catalítico de Mn

mRNA: RNA mensageiro

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida

NB: Neuroblastoma

NBT: Azul de nitrotetrazólio

NLS: Sinal de localização nuclear

N-TAD: Domínio de transativação – extremidade NH₂-terminal

O₂^{•-}: Radical superóxido

O₂: Oxigênio

OD_{600nm}: Densidade ótica a 600 nanômetros

ODDD: Domínio de degradação dependente de oxigênio

PAS: domínio comum encontrado nos genes *per1*, *arnt*, *ahr* e *sim*.

PGK: Fosfoglicerato quinase

PHD: Proteína com domínio de prolil hidroxilase

PMS: Fenazina metossulfato

PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinase

pol II: Polimerase II

pO₂: Pressão de oxigênio

Pro: Prolina

p53: gene supressor de tumor

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Rotações por minuto

SCLT: Meio seletivo sem Leucina nem Triptofano

Ser: Serina

SOD: Superóxido dismutase

t-BHP: Hidroperóxido de terc-butilo

TCA: Ácido tricloroacético

TF: Fator de transcrição

Thr: Treonina

TNB: ácido 2-nitro-5 -mercapto-benzóico

TRXSH₂: Tioredoxina

UPS: Sistema proteassoma-ubiquitina

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VHL: von Hippel Lindau

VOPs: Poluentes orgânicos voláteis

YNB: Base nitrogenada de levedura

Z-LLF-CHO: Inibidor de proteasoma

1. INTRODUÇÃO

A expressão de proteínas heterólogas na levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido usada em diferentes pesquisas (Braliou et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Gellissen and Hollenberg, 1997; Gralla and Valentine, 1991; Inoue et al., 1993; Lushchak et al., 2005; Martin and Scheinbach, 1989) visando o estudo de suas funções ou, no caso de proteínas de interesse comercial, sua produção em larga escala. As duas subunidades que compõem o fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1) humano, alfa e beta, foram expressas heterologamente em *S. cerevisiae* com o objetivo de estudar a função deste importante fator de transcrição que regula a resposta celular à variações nas concentrações de oxigênio (Braliou et al., 2006; FERREIRA, 2006). As leveduras que expressam as subunidades do HIF-1 humano construídas pelo Dr. Túlio César Ferreira

A hipóxia ocorre quando há baixa concentração de oxigênio nos tecidos e nas células, devido a diversos fatores tais como alterações nos mecanismos de transporte de oxigênio, obstrução física do fluxo sanguíneo ou à uma reduzida pressão atmosférica (Semenza, 2012). A hipóxia crônica induz a expressão de vários genes que codificam proteínas que aumentam a síntese de ATP e a capacidade de transporte de oxigênio no sangue, assim como o número de capilares que irrigam o tecido hipóxico (Galanis et al., 2008; Piret et al., 2002). Considera-se que tais respostas têm um papel fisiológico porque são adaptativas, rapidamente reversíveis e induzidas com níveis moderados de hipóxia (Piret et al., 2002). O estado hipóxico é uma característica de quase todos os tipos de tumores sólidos, incluindo tumores do cérebro, do cólon, da mama, do colo do útero, da próstata, e cabeça e pescoço (Höpfl et al., 2004).

Condições de hipóxia provocam respostas celulares destinadas a melhorar a oxigenação e sobrevivência celular através de vários mecanismos, como a promoção da angiogênese, aumento do fluxo glicolítico para a produção de energia e a regulação positiva de proteínas relacionadas à sobrevivência ou apoptose. A proteína mais importante que regula a resposta molecular dos mamíferos à hipóxia é o heterodímero fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1) (Höpfl et al., 2004; Kaluz et al., 2008; Semenza, 2010). O HIF-1 é formado por duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β (ARNT, em inglês), a subunidade HIF-1 α é estabilizada sob condições de hipóxia, o que lhe confere seletividade na resposta hipóxica. Quando HIF-1 α se acumula, é translocada para o núcleo onde forma o dímero com a subunidade HIF-1 β , produzindo o HIF-1 funcional, que se liga nos elementos de resposta a hipóxia (HRE, em

inglês) presentes nos genes alvo (Rezvani et al., 2011; Semenza, 2012). O HIF-1 ativa a expressão de genes alvos envolvidos na angiogênese, transporte de oxigênio, metabolismo de ferro, glicólise, captação de glicose, sinalização do fator de crescimento, apoptose, invasão, metástase e na resposta celular ao estresse oxidativo (Galanis et al., 2008; Ong and Hausenloy, 2012; Semenza, 2012), esses últimos são muito importantes já que a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um processo normal no ambiente celular e quando os níveis de EROs aumentam podem estes interagir com macromoléculas danificando as células e causando a sua morte (Bárdos and Ashcroft, 2005; Semenza, 2010).

A geração de EROS é um processo inevitável da vida sob condições aeróbias, estes são continuamente gerados na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e por algumas vias metabólicas específicas como a oxidação de lipídios nos peroxissomos. . EROs são metabolizados/eliminados por meio de mecanismos celulares enzimáticos (por exemplo, por meio de enzimas antioxidantes como a catalase e a superóxido dismutase) e não-enzimáticos (por exemplo, por meio das vitaminas e e C). No entanto, em algumas circunstâncias, o equilíbrio entre a produção de EROs e sua eliminação é perturbado levando a um nível de maior de oxidação, chamado de "estresse oxidativo" (Lushchak, 2011).

Atualmente sabe-se que as EROs funcionam como mensageiros secundários e participam na transdução de sinais. EROS desempenham funções definidas através de modificações redox de uma grande diversidade de moléculas que participam em quase todas as vias de sinalização já descritas, e, curiosamente, muitas proteínas envolvidas no desenvolvimento são sensíveis às condições de estresse oxidativo (Allen and Tresini, 2000; Covarrubias et al., 2008). Entre as macromoléculas que são susceptíveis ao estresse oxidativo e a sofrer modificações redox pelas EROs, encontram-se proteínas envolvidas em vias de sinalização celular e os fatores de transcrição (Allen and Tresini, 2000). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sido usado como agente oxidante para a detecção de genes sensíveis ao estado redox. Embora muitos dos efeitos causados por oxidantes estejam associados com as vias que controlam as respostas celulares ao estresse ou dano, outros não (Allen and Tresini, 2000). Mudanças redox que alteram a expressão de genes não estão limitadas ao aumento da oxidação. O tratamento com antioxidantes, pode também estimular aumentos na expressão de certos genes (Galanis et al., 2008).

Os mecanismos moleculares pelos quais as células de mamíferos detectam a hipóxia e transduzem o sinal para o HIF-1 α ainda não são claros. Estudos recentes forneceram

evidencia experimental suportando a hipótese de que a geração de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) mitocondrial e a subsequente formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são necessários para a indução da atividade de HIF-1 e a transcrição de genes nas células hipóxicas. Este modelo propõe, assim, que a geração de EROs aumenta sob condições de hipóxia, (Semenza, 2001; Semenza, 2012).

Por essas razões se faz necessário desenvolver mais pesquisas que levem a um entendimento maior da ação das EROs na célula e especialmente sobre o fator de transcrição HIF-1.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FATORES DE TRANSCRIÇÃO

As células empregam um sistema de expressão gênica complexo, que lhes permite reprogramar sua composição genética em resposta a diferentes ambientes e demandas de crescimento (Hashim et al., 2014). A regulação gênica se produz principalmente ao nível da transcrição dos genes, onde a informação genética herdada no DNA é transcrito em RNA e traduzida à proteína. Diferentes genes são transcritos em diferentes tipos de células, e como resposta a diversos estímulos, tais como: hormônios, fatores de crescimento, mudanças no estado nutricional, estresse, dano físico, e inflamação, o que resulta no controle da progressão do ciclo celular, da proliferação, diferenciação e forma das células, mobilidade e as interações com as células vizinhas (Hashim et al., 2014; Karamouzis et al., 2002; Neph et al., 2012; Papavassiliou, 1998).

Os Fatores de transcrição (TFs) são os principais efetores do controle genico eucariótico, os TFs humanos podem regular de centenas a milhares de genes downstream. De particular interesse são as interações em que um TF dado regula outro TF, ou ele mesmo; essa mútua regulação cruzada entre grupos de TFs, define sub-redes regulatórias que sustentam as principais características da identidade celular e funções complexas tais como pluripotência (Neph et al., 2012). Os TFs podem ser divididos em dois grupos principais, os fatores de transcrição basais (BTFs, em inglês) e os fatores de transcrição de genes específicos (GSTFs, em inglês) (Karamouzis et al., 2002). Os BTFs são necessários para a iniciação da transcrição de todos os genes que codificam proteínas (Hurst, 1996), esses fatores podem se ligar ou não ao DNA e sua função principal é recrutar a polimerase II (pol II) ao centro da região promotora do gene, a qual contém sequências reguladoras características, tais como: a caixa TATA (situada 25-30 bp “upstream” do sítio de início da transcrição) ou o elemento iniciador (fazendo sobreposição no sítio de início da transcrição). Os BTFs reconhecem essas sequências e formam um complexo em torno delas, o qual incorpora pol II de uma forma gradual, esse complexo é chamado de Aparato Basal de Transcrição (BTA= pol II e BTFs) (Karamouzis et al., 2002) (Figura 1).

O segundo grupo de TFs são mais específicos em relação às células onde se expressam e aos seus genes alvo. Podem ser ativados somente em determinados pontos do ciclo celular,

ou outros podem ser sintetizados dentro de tipos celulares definidos em certos estágios de desenvolvimento. Esses TFs geralmente possuem dois domínios funcionais, um deles reconhece e se liga especificamente a sequências de DNA dentro dos elementos reguladores do gene; no entanto o outro domínio interage com a maquinaria basal para regular a eficiência no início da transcrição (Hurst, 1996). Desse modo, os chamados fatores “upstream” podem estimular a iniciação da transcrição (fatores ativadores, enhancers) ou interferir com o processo (fatores repressores, silencers) dependendo da natureza da sua interação com os fatores gerais (Hurst, 1996) (Figura 1).

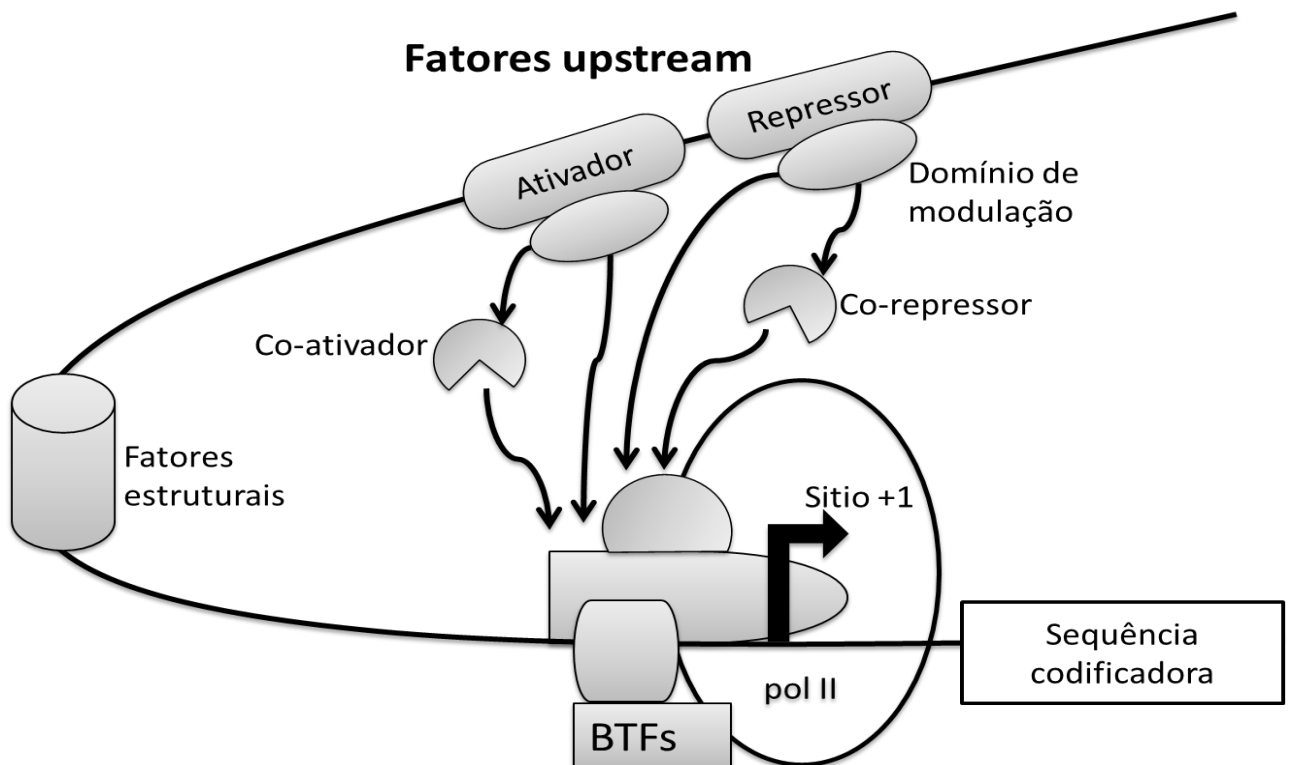


Figura 1. Montagem dos complexos de iniciação da transcrição. A primeira base de um gene que é transcrito em RNA, designada sitio + 1, aparece como uma seta, imediatamente “upstream” da sequência codificadora do gene. As sequências de DNA nas imediações desta primeira base (o promotor proximal) estão vinculadas a fatores de transcrição basais (BTFs) que induzem o recrutamento da holoenzima pol II ao gene. A eficiência com que os BTFs reconhecem/liga-se a um promotor particular é influenciado pela presença de fatores “upstream”. Estes se ligam especificamente às sequências dentro de regiões de promotor/potenciador do gene através de seus domínios de ligação ao DNA. Após a ligação, os fatores “upstream” podem aumentar (ativador) ou diminuir (repressor) a ligação dos BTFs através de interações proteína-proteína por meio dos seus domínios de modulação da transcrição. Essas interações podem ser diretas ou via co-ativadores/co-repressores. Para as interações proteína-proteína ocorrer, o DNA do promotor deve ser dobrado ou curvado. Isto pode ser conseguido, em parte, pela ligação dos BTFs e os próprios fatores “upstream”, em combinação com as proteínas de formação de cromatina ou, como mostrado aqui, os fatores de transcrição específicos de arquitetura podem também ajudar a estabilizar uma curvatura no DNA. Baseado em Hurst (1996).

Inúmeros TFs integram os sinais celulares e intercelulares para gerar um perfil de expressão de genes que é característico das propriedades bioquímicas e celulares de uma célula, este perfil de genes expressos muda dinamicamente ao longo do estado de desenvolvimento da célula e seu estado de diferenciação. A maquinaria bioquímica à qual os TFs integram seus sinais é chamada de complexo basal de transcrição, no entanto essa não possui uma conformação geral, e mudanças nos fatores de transcrição basais exercem um papel específico no desenvolvimento embrionário, refletindo os limites e requerimentos da regulação genica embrionária (Veenstra and Wolffe, 2001).

Os fatores de transcrição desempenham um papel importante na regulação em longo prazo do crescimento celular, da diferenciação celular e das respostas a estímulos ambientais. Existe evidência de que estas proteínas estão intimamente associadas com o controle a nível genético do desenvolvimento e manutenção do estado de doença, e, portanto, fornecem alvos seletivos para intervenção farmacêutica (Papavassiliou, 1998; Spitz and Furlong, 2012; Zaret and Carroll, 2011).

2.1.1 Fator Induzível por Hipóxia-1 (HIF-1)

A hipóxia é um estado onde a pressão de oxigênio se encontra por embaixo de limites normais (Normóxia: 40 a 50 mmHg; Hipóxia: 5 a 10 mmHg) (Kaluz et al., 2008; Koh et al., 2008; Semenza, 2012). A hipóxia restringe as funções dos órgãos, tecidos e células, e pode ser causada por uma redução no fornecimento de oxigênio, por exemplo, ao estar numa altitude elevada ou por isquemia localizada causada pela interrupção do fluxo sanguíneo em uma área determinada (Kaluz et al., 2008; Koh et al., 2008). No entanto, a hipóxia também tem um papel importante e benéfico na fisiologia dos mamíferos, de fato, sua presença é crucial para uma embriogênese normal (Koh et al., 2008). No nível celular, a resposta à hipóxia inclui a mudança do metabolismo aeróbico para a glicólise anaeróbica e a expressão de uma variedade de proteínas de estresse que regulam a sobrevivência ou a morte celular (necrose, apoptose). As adaptações que ocorrem nos tecidos para aumentar a entrega de oxigênio incluem a indução da eritropoiese e a angiogênese (Koh et al., 2008; Rezvani et al., 2011; Semenza, 2012).

A expressão de centenas de genes é alterada em células expostas à hipóxia, e muitos destes genes são regulados pelo fator induzível por hipóxia (HIF-1) (Bárdos and Ashcroft, 2005; Haddad and Harb, 2005; Kaluz et al., 2008; Semenza, 2012; Xia et al., 2012). O HIF-1 também contribui para o crescimento de tumores e sua expressão aumentada tem sido relacionada com diagnósticos ruins em pacientes (Haddad and Harb, 2005). O envolvimento de HIF-1 em condições patofisiológicas tais como isquemia e câncer e seu valor como alvo terapêutico tem levado a um interesse considerável no entendimento da regulação deste fator de transcrição (TF) (Haddad and Harb, 2005; Semenza, 2010). O HIF-1 é o mais proeminente e melhor descrito fator de transcrição que ativa a expressão hipóxica de genes alvos envolvidos na angiogênese, transporte de oxigênio, metabolismo de ferro, glicólise, captação de glicose, sinalização de fator de crescimento, apoptose, invasão e metástase (Bárdos and Ashcroft, 2005; Galanis et al., 2008; Rezvani et al., 2011; Semenza, 2010; Semenza, 2012).

O HIF-1 é um heterodímero formado pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β também chamado de translocador nuclear receptor de aril hidrocarbono (ARNT) (Braliou et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Galanis et al., 2008; Rezvani et al., 2011; Ruas and Poellinger, 2005). O HIF-1 β se expressa constitutivamente nas células, enquanto que a expressão de HIF-1 α aumenta exponencialmente em células hipóxicas quando são expostas a concentrações de oxigênio menores que 6% (Mazure et al., 2004; Semenza, 2000; Semenza, 2001; Semenza, 2012).

HIF-1 α e o HIF-1 β são proteínas da família bHLH-PAS (basic-helix-loop-helix-PAS). O HIF-1 β promove a estabilização, independente de oxigênio, da subunidade HIF-1 α (Galanis et al., 2008; Höpfl et al., 2004; Semenza, 2001), e permite sua ligação ao DNA, nos sítios onde se encontram os elementos de resposta a hipóxia (HRE, em inglês). A porção amino terminal do HIF-1 α (aminoácidos 1-390) é necessária e suficiente para a dimerização com o HIF-1 β e para a ligação com o DNA. A subunidade HIF-1 α é ubiquitinada e submetida à degradação proteasomal em células não hipóxicas. Sob condições hipóxicas, a quantidade de HIF-1 α que é ubiquitinada decresce dramaticamente, resultando em um acúmulo da proteína. Um domínio de estabilização da proteína rico em Pro-Ser-Thr está localizado entre os aminoácidos 429 e 608 do HIF-1 α (Koh et al., 2008; Semenza, 2000; Semenza, 2001, 2007) (Figura 2).

Os domínios bHLH e PAS compreendem as partes N-terminal do HIF-1 α e do HIF-1 β , os quais são requeridos para dimerização e a ligação ao DNA. A fração C-terminal das duas

proteínas é necessária para a transativação. No caso do HIF-1 α , seus domínios de transativação estão localizados em dois resíduos de aminoácidos, 531-575 (N-terminal, N-TAD) e 786-826 (C-terminal, C-TAD), que são separados por um domínio inibitório. Dois sinais de localização nuclear (NLSs) estão situados nas partes N-terminal (aminoácidos 17-74) e C-terminal (aminoácidos 718-721). O motivo NLS do extremo C-terminal do HIF-1 α tem um papel crucial no processo de importação nuclear da proteína sob condição de hipóxia. Além disso, o HIF-1 α contém um domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD, em inglês) que compreende os aminoácidos 401-603. Esse domínio é responsável pelo controle da degradação de HIF-1 α pela via de ubiquitina-proteasoma. A deleção do ODDD estabiliza o HIF-1 α sob condições de normóxia já que as prolin hidroxilases não encontram a região e são incapazes de se ligar ao HIF-1 α e marcar ele para degradação pelo proteasoma (Braliou et al., 2006; Galanis et al., 2008; Haddad and Harb, 2005; Höpfl et al., 2004; Semenza, 2000) (Figura 2).

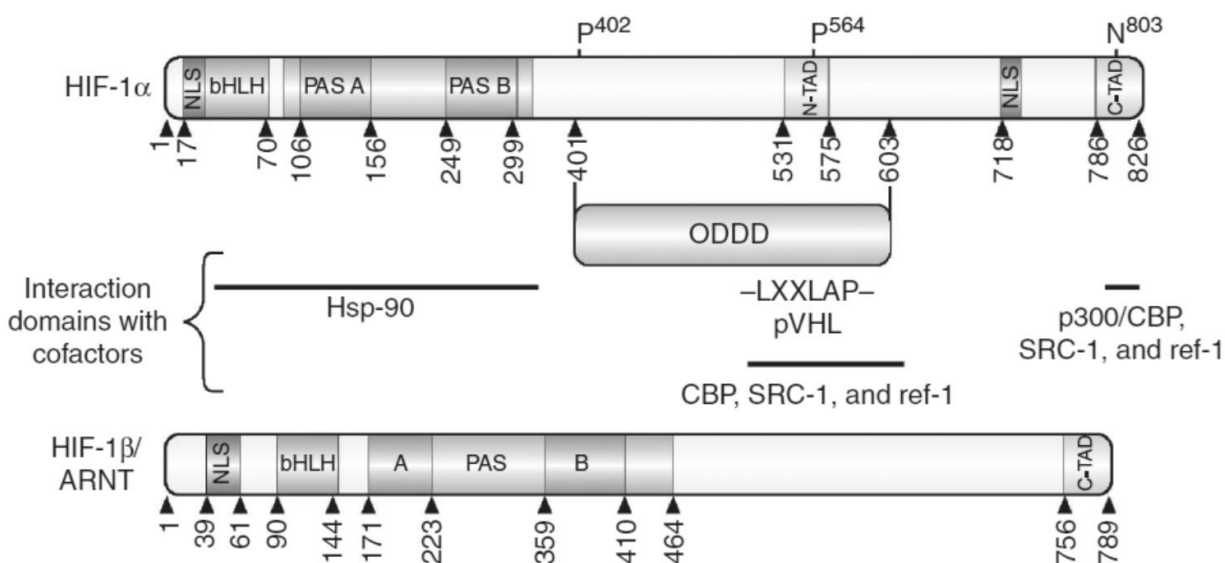


Figura 2. Representação esquemática do HIF-1 α e HIF-1 β humano. Os principais domínios funcionais das subunidades HIF-1 α e HIF-1 β são indicados como se segue: bHLH, domínio "helix-loop-helix" básico; PAS, domínio de homologia Per-ARNT-Sim com repetições A e B; NLS-N e NLS-C, sinais de localização nuclear amino e carboxi-terminal; N-TAD e C-TAD, domínios de transativação amino e carboxi-terminal; ODDD, domínio de degradação dependente de oxigênio; Domínios de interação com von Hippel-Lindau (VHL) e outros co-fatores são indicados, assim como os números de aminoácidos para cada domínio. Hsp-90, proteína de choque térmico-90; LXXLAP, motivo necessário para a interação com prolin hidroxilase (PHD) e VHL, pVHL, proteína VHL. Fonte: Rezvani *et al.* (2011).

2.1.2 Regulação do HIF-1

Os mRNAs do HIF-1 α e o HIF-1 β são expressos constitutivamente e de modo ubíquo, independentemente do nível de oxigênio nas células (Bárdos and Ashcroft, 2005; Rezvani et al., 2011). A regulação do HIF-1 α ocorre no nível da estabilidade da proteína: enquanto o HIF-1 β é expresso e usado em outros processos celulares, a proteína HIF-1 α acumula-se sob condições de hipóxia. Em condições de normóxia, HIF-1 α é uma proteína muito instável com um tempo de vida médio de 5 minutos. Essa rápida degradação é mediada via hidroxilação dos resíduos prolil e asparaginil: a hidroxilação dos resíduos de prolina 402 e 564 do HIF-1 α humano media a ligação da proteína von Hippel-Lindau (VHL), o substrato de reconhecimento faz parte de um complexo E3 ligase que torna o HIF-1 α alvo para degradação proteasomal (Bárdos and Ashcroft, 2005; Braliou et al., 2006; Höpfl et al., 2004; Rezvani et al., 2011). O resíduo de leucina 574 media o reconhecimento de HIF-1 α pelo VHL o que causa o recrutamento de uma prolil hidroxilase (PHD) para hidroxilação de Pro 564, porém os resíduos de Pro 402 e 564 podem interagir com VHL independentemente. A hidroxilação aumentada da Pro 564 pela ciclosporina resulta no aumento da associação do VHL com HIF-1 α e previne sua estabilização hipóxica. A perda de VHL resulta na estabilização do HIF-1 α endógeno nas células em normóxia, o qual pode ser revertido pela reintrodução de VHL (Bárdos and Ashcroft, 2005; Galanis et al., 2008) (Figura 3).

Dado que a reação de hidroxilação requer oxigênio e ferro molecular, as hidroxilases de HIF-1 α não podem funcionar muito tempo sob condições hipóxicas, como consequência o VHL não pode marcar o HIF-1 α para ubiquitinação, permitindo seu rápido acúmulo na célula, translocação ao núcleo, dimerização com HIF-1 β e ligação as sequencias HRE nos promotores dos genes alvos (Bárdos and Ashcroft, 2005; Rezvani et al., 2011).

Além da regulação negativa do HIF-1 α pela via de degradação proteasomal, existem outros mecanismos que contribuem para a diminuição da atividade de HIF-1 α e os níveis da proteína, tanto na normóxia quanto na hipóxia. As interações proteína-proteína são a principal ferramenta para inibir o HIF-1 α direta ou indiretamente mediante a inibição de sua interação com co-ativadores ou mediante modificações que podem tornar inativa a proteína HIF-1 α ou aumentar sua degradação via ubiquitinação mediada por VHL (Bárdos and Ashcroft, 2005;

Galanis et al., 2008). Entre os mecanismos de regulação negativa ou inibição do HIF-1 se encontram algumas proteínas como FIH-1, ARD1, CITED2/CITED4, p53 e FOXO4, e entre as proteínas que atuam na regulação positiva ou ativação estão as cascatas de sinalização de Ras/Raf/MAPK e PI3-K/Akt/PKB (Manolescu et al., 2009), EGF, IGF-1, IGF-2, Insulina, FSH, angiotensina II e as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Bárdos and Ashcroft, 2005; Haddad and Harb, 2005; Höpfl et al., 2004; Rezvani et al., 2011; Semenza, 2001; Semenza, 2012) (Figura 3).

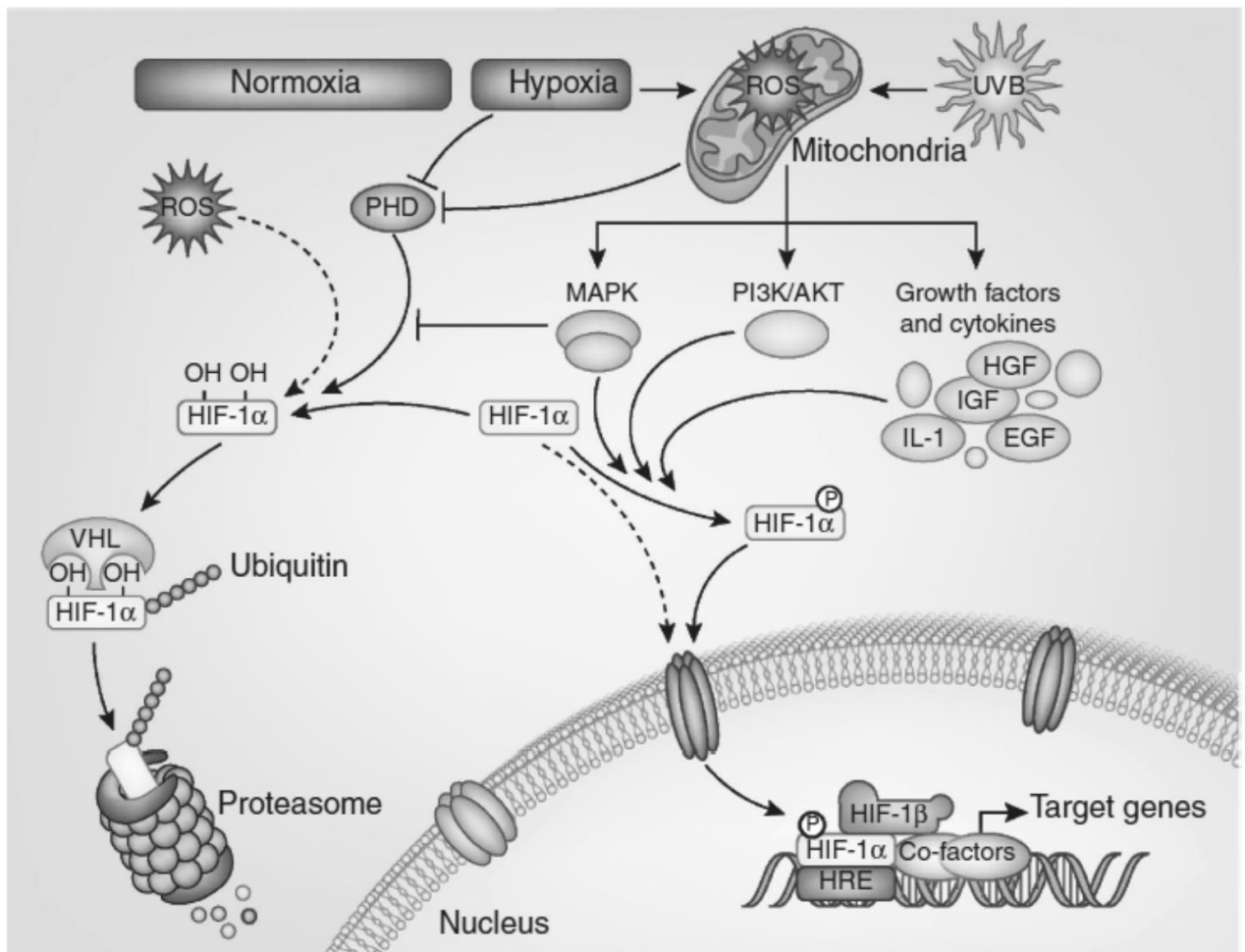


Figura 3. Mecanismo de regulação da expressão gênica do HIF-1. Em Normóxia (condições de oxigênio normais, pO_2 40 a 60 mmHg) o HIF-1 α é hidroxilado nos resíduos de prolina e asparagina. A proteína von Hippel Lindau (VHL) interage a través dos seus domínios β com os resíduos de prolina hidroxilados e recruta proteínas do sistema ubiquitin-ligase E3. Dessa forma o HIF-1 α é ubiquitinado e depois degradado pelo proteassoma. Sob condições de Hipóxia HIF-1 α é fosforilado e translocado ao núcleo onde polimeriza com a subunidade HIF-1 β (ARNT) formando HIF-1. O fator de transcrição funcional se liga na sequência conhecida como elemento de resposta a hipóxia (HRE) existente nos genes alvos e promove sua transcrição. Os fatores de crescimento, citocinas e a ativação do AKT também podem induzir a síntese de proteína HIF-1 α ou promovem o recrutamento de co-ativadores. AKT, proteína quinase B; HGF, fator de crescimento de hepatócitos; EGF, fator de crescimento epidérmico; IGF, fator de crescimento semelhante à insulina; IL-1, interleucina 1; MAPK, proteína quinase ativada por mitógenos; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; ROS, espécies reativas de oxigênio. Fonte: Rezvani *et al.* (2011).

As proteínas HIF-1 α e HIF-1 β pertencem a uma família crescente de proteínas relacionadas. Até o momento, três isoformas do HIF- α foram descritas (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), assim como HIF-2 β e HIF-3 β , entre estas HIF-1 α , HIF-2 α são as melhores descritas. Cada uma das isoformas apresenta um padrão de expressão em tecidos específicos (Manolescu et al., 2009). HIF-1 α e HIF-2 α revelaram similaridades *in vitro* relativas à sua organização genômica, estrutura proteica modular, estabilização hipóxica da proteína, heterodimerização com HIF-1 β , reconhecimento de DNA, ligação ao DNA e transativação de genes repórter (Haddad and Harb, 2005). HIF-1 α é expressa ubiquamente, enquanto HIF-2 α mostra uma expressão tecido-específica. HIF-2 α (chamada também proteína-1 endotelial PAS, EPAS-1) é também upregulada por hipóxia, se liga a HIF-1 β para formar o complexo HIF-2, o qual ativa a transcrição pela ligação nos HREs. Além disso, é regulada pelas mesmas vias do HIF-1 α . HIF-3 α tem uma semelhança elevada com o HIF-1 α e HIF-2 α no domínio bHLH e nos domínios PAS, mas carece de estruturas para a transativação encontradas no C-terminal de HIF-1 α e HIF-2 α (Bárdos and Ashcroft, 2005). HIF-3 α pode também formar dímeros com HIF-1 β para ativar a transcrição dos HREs, esta isoforma possui diversas variantes de processamento, entre elas a proteína inibitória com domínio PAS, a qual é uma proteína truncada que funciona como um inibidor negativo dominante de HIF-1 (Bárdos and Ashcroft, 2005; Koh et al., 2008; Xia et al., 2012).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo ocorre quando os antioxidantes e os mecanismos de sobrevivência celular são incapazes de lidar com as espécies reativas de oxigênio (EROs) ou com o dano causado por elas. Vários processos de doenças incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, artrite e o envelhecimento têm sido associados com dano oxidativo (Morano et al., 2012). Radicais reativos derivados do oxigênio molecular (espécies reativas de oxigênio, EROs) e nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio, ERNs) atacam rapidamente moléculas biológicas importantes, incluindo lipídios, DNA e proteínas celulares essenciais (Circu and Aw, 2010).

2.2.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Espécies reativas de oxigênio (EROs) é o nome genérico dado a uma variedade de moléculas não-radicalares e radicais livres derivadas de oxigênio, entre as quais se encontram o íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) entre outros (Barreiros et al., 2006; Bennett, 2001; Engel and Evens, 2006; Stowe and Camara, 2009; Tudek et al., 2010) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Espécies radicalares	Espécies não radicalares
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peroxido de hidrogênio (H_2O_2)
Hidroperoxil (HOO^{\bullet})	Hidroperóxido (ROOH)
Hidroxil (HO^{\bullet})	Ácido hipocloroso (HClO)
Peroxil (ROO^{\bullet})	Ozônio (O_3)
Alcolxil (RO^{\bullet})	Oxigênio singleto (1O_2)

Fonte: Barreiros *et al.* (2006), com adaptações.

A principal fonte das EROs é a mitocôndria, eles são inevitavelmente formados como produtos da respiração aeróbica na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente nos complexos I e III (Figura 4), mas podem formar-se em vários outros processos anabólicos e catabólicos tais como o ciclo de Krebs e a formação de polissacarídeos (Bernardi et al., 1999; Stowe and Camara, 2009). São altamente reativas e podem atuar sobre macromoléculas biológicas, modificar a estrutura e função das proteínas, causar dano oxidativo ao DNA e atuar como iniciadores da apoptose (Bernardi et al., 1999; Circu and Aw, 2010; Covarrubias et al., 2008; Engel and Evens, 2006; Jackson and Loeb, 2001; Morano et al., 2012; Thannickal and Fanburg, 2000; Waris and Ahsan, 2006; Weinberg et al., 2010).

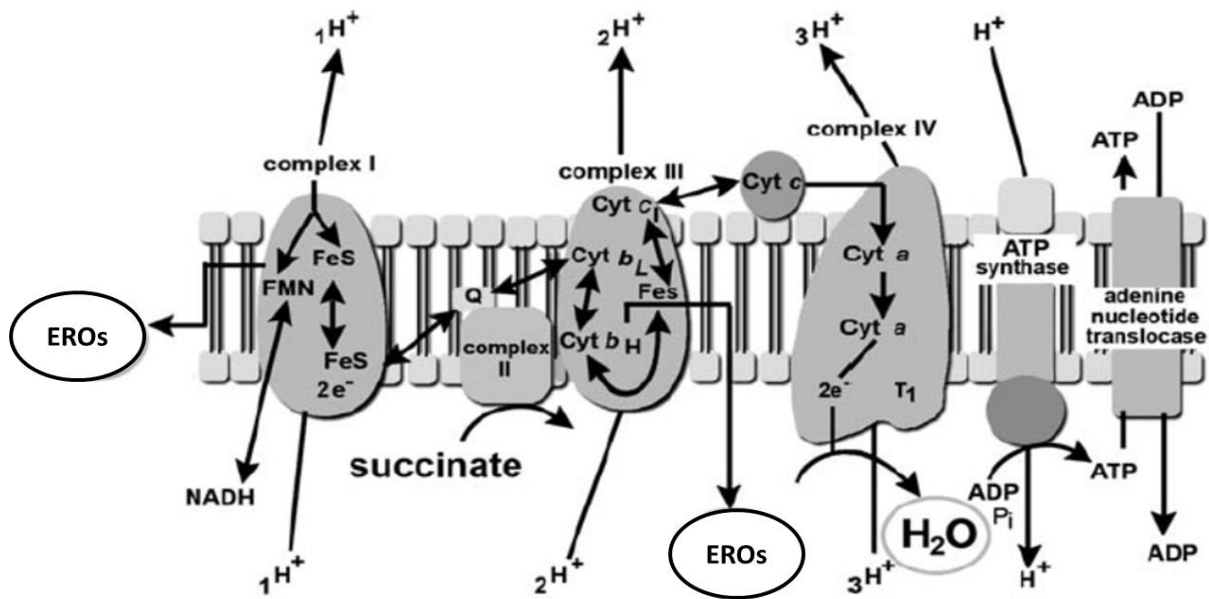


Figura 4. Formação de EROs na cadeia de transporte de elétrons (ETC) mitocondrial. Durante o processo da respiração celular se produz o vazamento de elétrons nos complexos I e III da ETC mitocondrial, esses elétrons reagem com o oxigênio (O_2) e formam o radical superóxido (O_2^{\bullet}), a espécie reativa de oxigênio mais perigosa. Fonte: Stowe and Camara (2009)

Atualmente, sabe-se que as EROs, quando são estreitamente reguladas, executam funções como segundos mensageiros em processos de sinalização intracelular (Circu and Aw, 2010; Covarrubias et al., 2008; Raval et al., 2006; Waris and Ahsan, 2006), estes existem em todas as células aeróbicas num equilíbrio com os antioxidantes bioquímicos (Waris and Ahsan, 2006), mas um desequilíbrio no seu conteúdo intracelular pode induzir a morte por apoptose pelo estresse oxidativo (Tudek et al., 2010).

A formação de EROs pode ocorrer por exposição à radiação gama (γ), X, UV, pela biotransformação química de alguns componentes da dieta, reações inflamatórias, e também como resultado do metabolismo realizado nas células (Tudek et al., 2010). As EROs podem ser geradas também em fontes não mitocôndrias, tais como o citocromo *b5* redutase, peroxissomas, catecolaminas, hidroquinonas, oxidases da membrana plasmática como a NADPH-oxidase, lipoxigenase, oxidases de monoamina, xantina / xantina oxidase, sintases de óxido nítrico acoplados ou não acoplados, vias eicosanóides, entre outros (Stowe and Camara, 2009; Thannickal and Fanburg, 2000; Tudek et al., 2010). As maiorias destes compostos podem perder um elétron por autooxidação e formar o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), no entanto, essas EROs formadas ou liberadas no citosol são tamponadas sob fortes condições redutoras por tióis intracelulares, em particular a glutatona (GSH) e tioredoxina ($TRXSH_2$) pela ação das suas redutases (Thannickal and Fanburg, 2000).

Em condições de normóxia, a ação do HIF-1 é controlada pela degradação da subunidade HIF-1 α pelo proteasoma, mediada pela ligação à proteína VHL (Hamanaka and Chandel, 2009), mas quando as células são expostas a ambientes pobres em oxigênio, se apresenta o fenômeno de estresse oxidativo, e uma das principais mudanças a nível celular ocorre na mitocôndria, exatamente na cadeia de transporte de elétrons (ETC, em inglês), essas mudanças finalmente levam a geração de EROs (Bell and Chandel, 2007; Semenza, 1998). As EROs têm mostrado estar diretamente ligadas à ativação do HIF-1, elas atuam como sinais iniciais em cascatas que promovem a transcrição do HIF-1, além de participarem na estabilização da subunidade HIF-1 α , já que uma alta produção de EROs evita que as proil-hidroxilases (PHDs) hidroxilem o HIF-1 α , inibindo assim sua degradação pelo proteasoma (Bell and Chandel, 2007).

Em condições de hipóxia, as EROs mitocondriais também podem ativar vias de sinalização upstream do HIF-1 α : como as vias MAP quinase ERK e p38. Tem sido demonstrado que ERK2 ativado fosforila HIF-1 α *in vitro* e *in vivo* e aumenta a atividade transcricional, ERK2 também fosforila os co-ativadores p300/CBP e promove a interação com HIF-1 α aumentando a transcrição (Galanis et al., 2008). HIF-1 tem sido implicado na carcinogênese induzida por EROs em uma ampla gama de cânceres humanos, tais como o do ovário, próstata e câncer de mama. No microambiente deficiente em oxigênio ou após a estimulação hormonal, HIF-1 α é ativado por EROs através de uma rede de sinalização complexa. HIF-1 age como um chefe orquestrador dos eventos que levam à adaptação metabólica, a proliferação celular contínua, aumento na vascularização e tolerância contra apoptose, promovendo assim a progressão e agressividade do tumor (Galanis et al., 2008; Semenza, 2010).

2.2.2 Agentes Oxidantes

2.2.2.1 Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂).

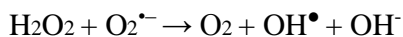
O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Figura 5) é a espécie reativa de oxigênio (ERO) mais abundante *in vivo*, se produz continuamente no interior da célula como um subproduto do metabolismo aeróbico, ou extracelularmente pelas células fagocitárias do hospedeiro

estimuladas durante processos inflamatórios (Barreiros et al., 2006; Folmer et al., 2008; Sousa-Lopes et al., 2004). O H_2O_2 é um oxidante ubíquo presente em todos os organismos aeróbios. Desde a sua primeira identificação em uma célula viva, o H_2O_2 foi considerado um subproduto tóxico do metabolismo aeróbico, algo que as células tinham que remover. Se a desintoxicação de H_2O_2 catalisada por catalases e peroxidases não era adequada, este pode difundir nas células e oxidar alvos biológicos causando disfunções celulares responsáveis por diversas patologias e o envelhecimento (Chance et al., 1979; Marinho et al., 2014).

Ao contrário da suposição comum que H_2O_2 difunde livremente através de biomembranas tem sido demonstrado em estudos em células T Jurkat, células de mamíferos, *Escherichia coli* e em *Saccharomyces cerevisiae*, que as biomembranas formam uma barreira contra a difusão do H_2O_2 (Branco et al., 2004; Folmer et al., 2008; Ng et al., 2008). Quando as células são expostas a H_2O_2 externo o consumo intracelular de H_2O_2 catalisado pelas enzimas antioxidantes gera uma gradiente de H_2O_2 através da membrana plasmática, o qual torna a concentração de H_2O_2 intracelular mais baixa do que a externa. A magnitude deste gradiente é dependente da medida do consumo intracelular de H_2O_2 e sobre as propriedades de permeabilidade das barreiras celulares para o H_2O_2 (Branco et al., 2004; Folmer et al., 2008; Sousa-Lopes et al., 2004). A permeabilidade da membrana plasmática para H_2O_2 está sob regulação ativa em células de *S. cerevisiae* durante a adaptação ao H_2O_2 , fazendo parte dos mecanismos celulares de resposta ao estresse oxidativo (Sousa-Lopes et al., 2004).

O H_2O_2 é um agente oxidante forte, ainda que na sua estrutura química não possua elétrons desemparelhados, tem uma alta reatividade o que lhe confere a capacidade de danificar macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Barreiros et al., 2006; Chance et al., 1979). Pode combinar-se com íons metálicos (ferro ou cobre) na reação de Fenton (reação 1), gerando o radical hidroxil, altamente tóxico, o qual apresenta uma alta reatividade, podendo reagir facilmente com qualquer molécula, como por exemplo DNA, proteínas e lipídeos. O radical hidroxil pode ser formado também por meio da reação do H_2O_2 com $\text{O}_2^{\bullet-}$ (reação 3, reação de Haber-Weiss), a qual é o somatório da reação de Fenton (Reação 1) e a reação de reciclagem do Ferro (II) (reação 2) (Cardoso et al., 2012)





Reação de Harber-Weiss (3)

2.2.2.2 Menadiona (MD)

A menadiona (MD, 2-metil-1,4-naftoquinona) ou vitamina K3 (Figura 5) é uma quinona que tem sido usada em estudos de dano oxidativo e como agente terapêutico para tratamento do câncer (Castro et al., 2007; Flattery-O'Brien et al., 1993; Ządzinski et al., 1998). As quinonas como a menadiona apresentam duas propriedades químicas principais as quais lhe conferem a sua reatividade nos sistemas biológicos e seu potencial tóxico, dado que ela pode atuar como oxidante ou eletrófilo, mas devido a uma adição nucleofílica a uma quinona, apresenta uma redução formal de dois elétrons, pelo qual suas propriedades oxidativas e eletrofílicas estão fortemente relacionadas (Castro et al., 2007).

Menadiona e outras quinonas podem sofrer uma redução de um ou dois elétrons. A redução em um elétron leva à formação de radicais semiquinonas, essa reação pode ser metabolizada por várias flavoenzimas, tais como NADPH citocromo P450 redutase, NADH citocromo b5 redutase e NADH-ubiquinona redutase, ou pode acontecer por reações não enzimáticas com vários tióis (Castro et al., 2007; Ządzinski et al., 1998). As semiquinonas são substâncias muito instáveis que reagem rapidamente com o oxigênio levando a formação de EROs, tais como o íon superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (Castro et al., 2007; Chiou and Tzeng, 2000; Flattery-O'Brien et al., 1993).

As quinonas também podem ser reduzidas por meio da redução de dois elétrons para as hidroquinonas correspondentes pela DT-diaforase [NAD (P) H: quinona oxidoredutase 1], sem a formação de intermediários de radical livre semiquinona, tem sido sugerido que esta via representa um mecanismo de desintoxicação (Chiou and Tzeng, 2000).

A citotoxicidade da MD é uma consequência do dano oxidativo induzido pelas EROs, estes incluem a indução de dano macromolecular, perturbações da homeostase do cálcio, diminuição dos tióis celulares e aumento da peroxidação lipídica (Castro et al., 2007; Chiou and Tzeng, 2000).

2.2.2.3 Hidroperóxido de Cumene (CHP)

O hidroperóxido de cumene (CHP, em inglês) (Figura 5) é uma substância citotóxica, genotóxica e mutagênica, induzindo danos ao DNA e mutações em sistemas procariotos e eucariotos. CHP tem sido frequentemente utilizada como um modelo para os efeitos biológicos dos hidroperóxidos de alquilo derivados de poluentes orgânicos voláteis (VOPs). Seu mecanismo envolve clivagem homolítica da ligação peróxido O-O por citocromos P450 para produzir o radical cumoxyl. Os efeitos são reforçados por metais e inibidos por depuradores de radicais livres tais como ácido ascórbico (Catalá et al., 2013).

Além dos seus efeitos prejudiciais, tais como danos na membrana, a lise celular, necrose de órgãos, promoção de tumores e, em certos aspectos do envelhecimento, foi relatado que este composto e / ou aldeídos citotóxicos dele derivados, inibem a síntese de proteína em fibroblastos da pele humanos (Ayala et al., 1996).

2.2.2.4 Hidroperóxido de terc-Butilo (t-BHP)

O hidroperóxido orgânico, hidroperóxido de terc-butilo (t-BHP, em inglês) (Figura 5), é um composto padrão útil para estudar os mecanismos de lesão celular oxidativo. A exposição de células eucarióticas para o t-BHP, o qual é permeável na membrana, induz uma série de eventos tóxicos, tais como a depleção de glutathiona reduzida (GSH) e de tióis proteicos, peroxidação de lipídeos da membrana, quebra da cadeia de DNA, a depleção significativa de ATP celular, alteração na homeostase do cálcio intracelular e a sinalização de Ca^{2+} , perda do potencial da membrana mitocondrial e, como um resultado destes eventos, necrose celular (Lapshina et al., 2005).

A glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de hidroperóxidos produzidos por várias reações no interior das células, terc-Butil hidroperóxido (t-BHP) é um hidroperóxido orgânico análogo aos hidroperóxidos de lipídeos de cadeia curta formados naturalmente. Este oxidante solúvel em água é reduzido em grande parte pela via glutathiona peroxidase para o produto álcool terc-butílico relativamente inerte. A GSSG formada nesta reação é reduzida pela glutathiona redutase a expensas de NADPH (Liu and Kehrer, 1996).

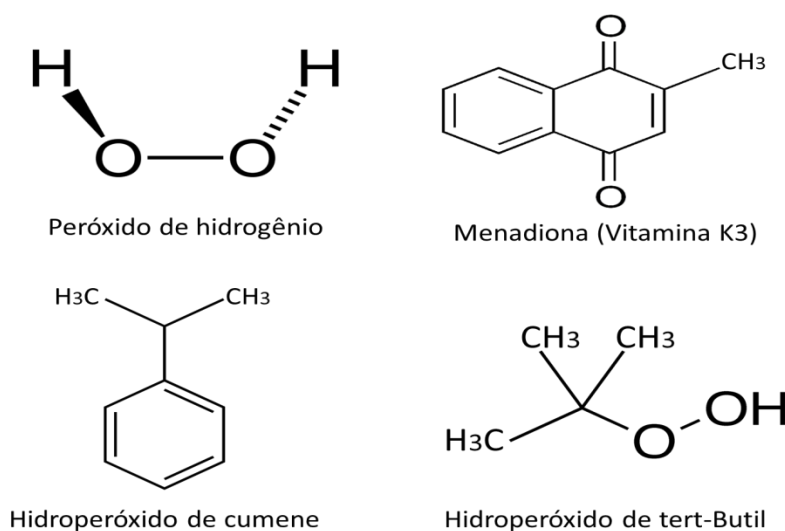


Figura 5. Estrutura química dos agentes estressores usados neste estudo

2.2.3 Agentes Inibidores

2.2.3.1 Aminotriazol (3-amino 1,2,4-triazole, ATZ)

Aminotriazol (ATZ) (Figura 6) é um composto heterocíclico tóxico agindo como um inibidor específico da catalase em eucariotos (Metodiewa and Brian Dunford, 1991; Vasykiv et al., 2011), além inibe a produção do hormônio da tiróide nos mamíferos e é um potente agente cataratogenico. Foi comprovado que inativa a catalase de fígado e rim, em sistemas *in vivo*. A inibição produzida *in vivo* é um processo lento e irreversível que requer algumas horas de exposição da enzima ao ATZ e ao H₂O₂. ATZ reage com o componente I da catalase o que conduz a uma inibição completa da atividade catalítica (Metodiewa and Brian Dunford, 1991; Nicholls, 1962), formando um típico complexo com catalase livre de ferro, isso cataliza a reducao do componente II por doadores de hidrogênio endógenos, de forma similar a outros ligandos ionicos (Nicholls, 1962).

ATZ é usado como herbicida e inibe o crescimento de muitas espécies de plantas, leveduras e bactérias. A inibição pode ser invertida, total ou parcialmente, por alguns produtos celulares naturais, dos quais a mais eficaz é a histidina (Klopotowski and Wiater, 1965).

2.2.3.2 *Butionina sulfoximina (BSO)*

L-Butionina-S, R-Sulfoximina (BSO, em inglês) (Figura 6) é um aminoácido sintético que depleta a glutatona através da inibição irreversível da enzima gama-glutamilcisteína sintetase (Marengo et al., 2008; Weldrick et al., 1999), que é frequentemente upregulada em tumores resistentes à quimioterapia. A inibição dessa enzima representa um passo crítico na biossíntese de glutatona. Tem-se demonstrado que ela inibe a resposta proliferativa de células T em humanos, além da inibição macrofágica, também se demonstrou que a exposição à BSO de linhagens de células de neuroblastoma (NB) provoca a apoptose como resultado de um aumento nos níveis basais de EROs (Marengo et al., 2008), a formação de EROs pode ser a consequência da desregulação das enzimas antioxidantes endógenas, como catalase, superóxido dismutase de cobre-zinco (Cu, Zn-SOD; SOD-1), e SOD que contém manganês (Mn-SOD; SOD-2), as quais atuam de forma sinérgica com o sistema redox GSH para fornecer defesa celular contra EROs (Marengo et al., 2008).

Em eucariontes superiores, a inibição da biossíntese da glutatona via BSO resulta em alterações ultra-estruturais que envolvem principalmente a deterioração das mitocôndrias (Weldrick et al., 1999). Na presença de metais pesados, a aplicação de butionina-sulfoximina (BSO), conduziu um decréscimo no conjunto citosólico da GSH e a uma limitação no crescimento da levedura *S. cerevisiae* (Prévéral et al., 2006).

2.2.3.3 *Deferoxamina (DFO)*

A Deferoxamina (DFO) (Figura 6) é uma molécula captadora de ferro (sideróforo) derivada de bactérias, exerce uma ação quelante de ferro e usado usualmente na clínica como uma droga em doenças do excesso de ferro, como hemocromatose, talassemia, a síndrome de displasia mielóide e anemia aplástica, também tem sido demonstrado que aumenta a expressão de fatores angiogênicos, tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), o que indica que afeta a angiogênese (Ikeda et al., 2011).

DFO tem sido utilizada para induzir a acumulação de HIF-1 α , mesmo sob condições de normóxia, dado que interfere com a ação das proil hidroxilases. Além disso, o DFO é frequentemente utilizado como um agente mimético de hipóxia, já que imita o efeito da

privação de oxigénio através da indução de um número de genes de resposta a hipóxia (Hou et al., 2013).

2.2.3.4 Inibidor de Proteasoma

Em células eucarióticas, o sistema proteassoma-ubiquitina (UPS) é responsável pela degradação não-lisossomal de proteínas e desempenha um papel primordial em processos vitais tais como homeostase das proteínas, processamento de antígenos ou proliferação celular (Schmidt and Finley, 2014; Stein and Groll, 2014). Sendo uma via evolutiva altamente conservada, muitas bactérias patogênicas têm desenvolvido pequenas moléculas as quais modulam a atividade dos componentes da UPS dos seus hospedeiros, tais produtos naturais são, devido à sua otimização gradual ao longo dos milênios, altamente potentes em termos de seus mecanismos de ligação, sua biodisponibilidade e seletividade (Stein and Groll, 2014).

O proteasoma é responsável pela reciclagem de proteínas celulares que regulam a proliferação celular e as vias de sobrevivência, pelo qual os defeitos da sua atividade proteolítica podem conduzir à proliferação celular descontrolada e como consequência o desenvolvimento do tumor. Tem sido demonstrado que a inibição da atividade do tipo quimotripsina (CHT-L) do proteasoma representa uma estratégia válida para induzir efeitos anti-neoplásicos em tumores hematológicos, além, um número crescente de estudos sugerem que os inibidores de proteasoma podem se tornar fármacos valiosos para o tratamento de doenças não tumorais, quando utilizados em condições em que as funções celulares são moduladas, sem a indução de morte celular (Scarbaci et al., 2014; Schmidt and Finley, 2014) (Figura 6).

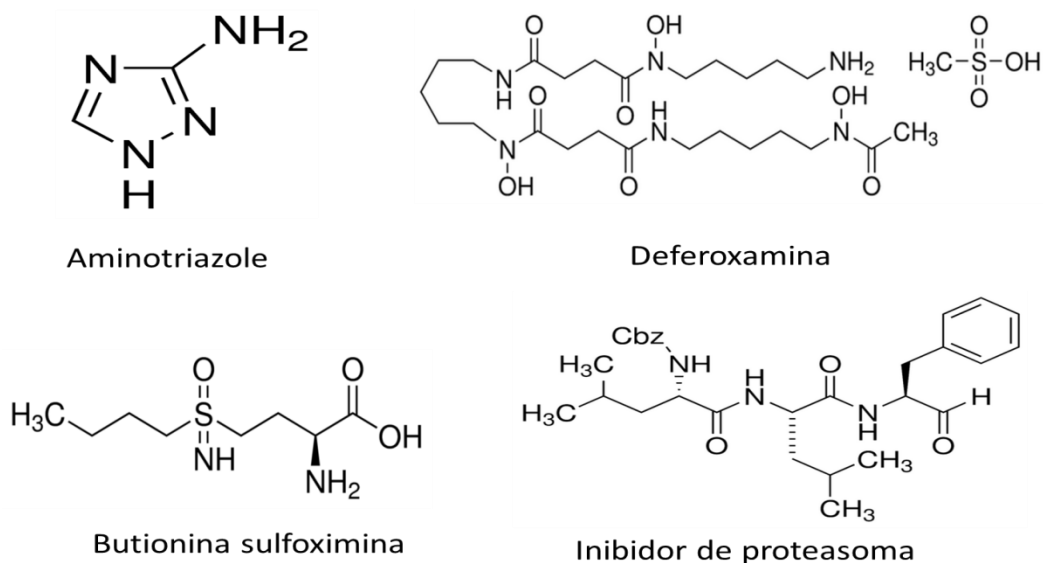


Figura 6. Estrutura química dos agentes inibidores usados neste estudo

2.3 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

As células possuem dois sistemas antioxidantes para ajudar a proteger seus componentes celulares e manter seu estado redox, sistemas enzimáticos e não enzimáticos (Jamieson, 1998; Rover Júnior et al., 2001). Estes são críticos para a sobrevivência de procariontos e eucariotos. Tecidos e órgãos têm diferentes índices de atividade metabólica e consumo de oxigênio. Os seus níveis de antioxidantes são também diferentes. Por exemplo, as concentrações de glutathiona (GSH) e de cisteína são menores no cérebro quando comparadas às concentrações no fígado, rim, ou do músculo de ratos. Pesquisas de resposta oxidativa em diferentes modelos *in vivo* sugerem que, em organismos complexos, tais como mamíferos, órgãos e tecidos contêm distintos sistemas antioxidantes, e isto pode constituir a base para a susceptibilidade diferenciada a agentes tóxicos ambientais (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009).

Os sistemas antioxidantes não enzimáticos consistem geralmente de pequenas moléculas que são solúveis em água, ou em alguns casos, em um ambiente lipídico, eles agem como eliminadores de radicais, sendo oxidados pelas EROs e dessa forma removem os oxidantes da solução (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009). Defesas antioxidantes celulares também incluem várias enzimas que são capazes de remover os radicais de oxigênio e seus produtos e / ou reparar os danos causados pelo estresse oxidativo (Jamieson, 1998).

2.3.1 Glutationa (GSH)

O melhor exemplo conhecido de um sistema de defesa antioxidante não enzimático é a glutatona (GSH), um tripeptídeo (γ -L-glutamyl-L-cystinylglycine). GSH atua como um eliminador de radicais com seu grupo redox sulfidrilo ativo, este reage com o oxidante para a formação de glutatona oxidada (GSSG). A glutatona reduzida (GSH) é, possivelmente, a mais abundante molécula redox eliminadora de EROs das células. Consequentemente, o seu papel na manutenção do estado redox celular é muito importante (Chiou and Tzeng, 2000; Hatem et al., 2014; Jamieson, 1998; Rover Júnior et al., 2001).

As enzimas glutatona peroxidases (GPxs) pertencem a uma família de enzimas filogeneticamente relacionadas, estas detoxificam uma variedade de metabólitos de oxigênio reativos e, portanto, protegem contra danos oxidativos, até o momento foram encontradas 8 GPxs em mamíferos (Rover Júnior et al., 2001; Ursini and Maiorino, 2013). Elas catalisam a redução de H_2O_2 pela GSH: $2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$. No ciclo da glutatona, a GSH é regenerada através da glutatona-redutase (GR): $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ (Figura 7). Por anos, GPxs têm sido conhecidas por catalisar a redução de H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos a água ou os álcoois correspondentes, usando glutatona (GSH) como redutor (Herbette et al., 2007). As GPxs da 1-4 são seleno-proteínas com uma selenocisteína (Sec) no seu centro catalítico (SecGPxs), a presença de Sec como o grupo catalítico foi sugerida para garantir uma reação rápida com o hidroperóxido e uma redução veloz por GSH (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013), as GPxs da 5-8 são proteínas com um centro catalítico de cisteína (Cys) (CysGPxs) porém, as CysGPxs não usam GSH como redutor, e usam majormente tioredoxin (Trx) e produzem Trx oxidado (TrxS_2), portanto estas CysGPxs em termos funcionais são tioredoxin peroxidases (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013; Herbette et al., 2007). Glutationa-S-transferase (GST) é uma família multigênica de isoenzimas que catalisam a conjugação de GSH com uma variedade de compostos electrófilos, como o primeiro passo de uma via de desintoxicação que leva à formação de ácido mercaptúrico (Chiou and Tzeng, 2000).

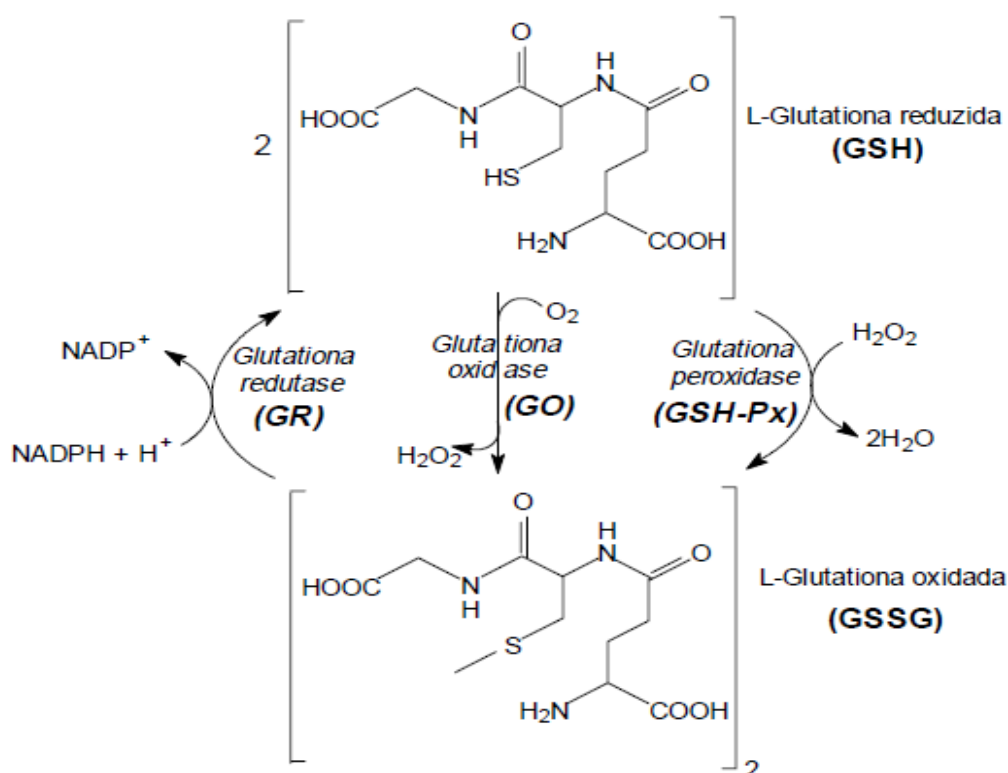


Figura 7. Interconversão de glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR). Fonte: Rover Júnior *et al.* (2001)

Os genes envolvidos na biossíntese de GSH foram identificados em *S. cerevisiae* (GSH1 e GSH2, que codifica um glutamylcisteína-sintetase e da glutatona-sintetase, respectivamente) e *gsh1* e *gsh2* mutantes foram isolados em leveduras (Jamieson, 1998). Estudos têm mostrado que a GSH é uma molécula antioxidante importante em leveduras. Mutantes com deficiência na síntese de glutatona são hipersensíveis ao H₂O₂, plumbagina e menadiona (geradores do ânion superóxido), assim como outros compostos, tais como o cádmio e metilglioxil. Apesar de serem hipersensíveis aos oxidantes, os mutantes deficientes em GSH são ainda capazes de induzir uma resposta de estresse adaptativo para ambos H₂O₂ e menadiona, sugerindo que a GSH não é importante como uma molécula sensor nessas respostas de estresse (Jamieson, 1998; Rover Júnior *et al.*, 2001; Welker, 2009). A perda de GSH pode resultar em proteção prejudicada contra a peroxidação lipídica, ou ruptura de macromoléculas vitais via formação de tioéter (Chiou and Tzeng, 2000).

2.3.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase (SOD) tem um papel importante na defesa antioxidante, sua função principal é catalisar a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A exposição da SOD ao H_2O_2 leva a uma inativação irreversível da enzima, a qual é dependente do pH e da concentração. A susceptibilidade proteolítica da enzima aumenta de forma dependente à concentração do H_2O_2 , também pode variar dependendo do tempo de exposição (Salo et al., 1988).

As células de levedura possuem duas enzimas SOD diferentes. SOD1 (CuZnSOD) contém cobre e zinco no sitio catalítico, e localiza-se no citosol, no espaço intermembranar mitocondrial (IMS), no núcleo, nos lisossomas e no retículo endoplasmático (Klöppel et al., 2010). SOD2 (MnSOD) é uma proteína dependente de manganês que se localiza na matriz mitocondrial. A SOD2 e a fração mitocondrial da SOD1 estão envolvidas na dismutação do superóxido gerado pela cadeia respiratória mitocondrial, no entanto a fração citosólica da SOD1 está envolvida na proteção contra o superóxido gerado por outras reações metabólicas e alguns xenobióticos (Herrero et al., 2008; Klöppel et al., 2010; Tao et al., 2010).

Algumas pesquisas demonstraram que a fração de SOD1 presente na IMS tem um papel muito importante na defesa antioxidante contra as EROs produzidas na cadeia respiratória mitocondrial, e evita a saída destes para o citoplasma (Klöppel et al., 2010), também tem se demonstrado que mutações nos genes de SOD estão envolvidos em doenças como a Esclerose lateral amiotrófica (ALS) (Rosen et al., 1993) e o Síndrome de Down (Casado et al., 2005).

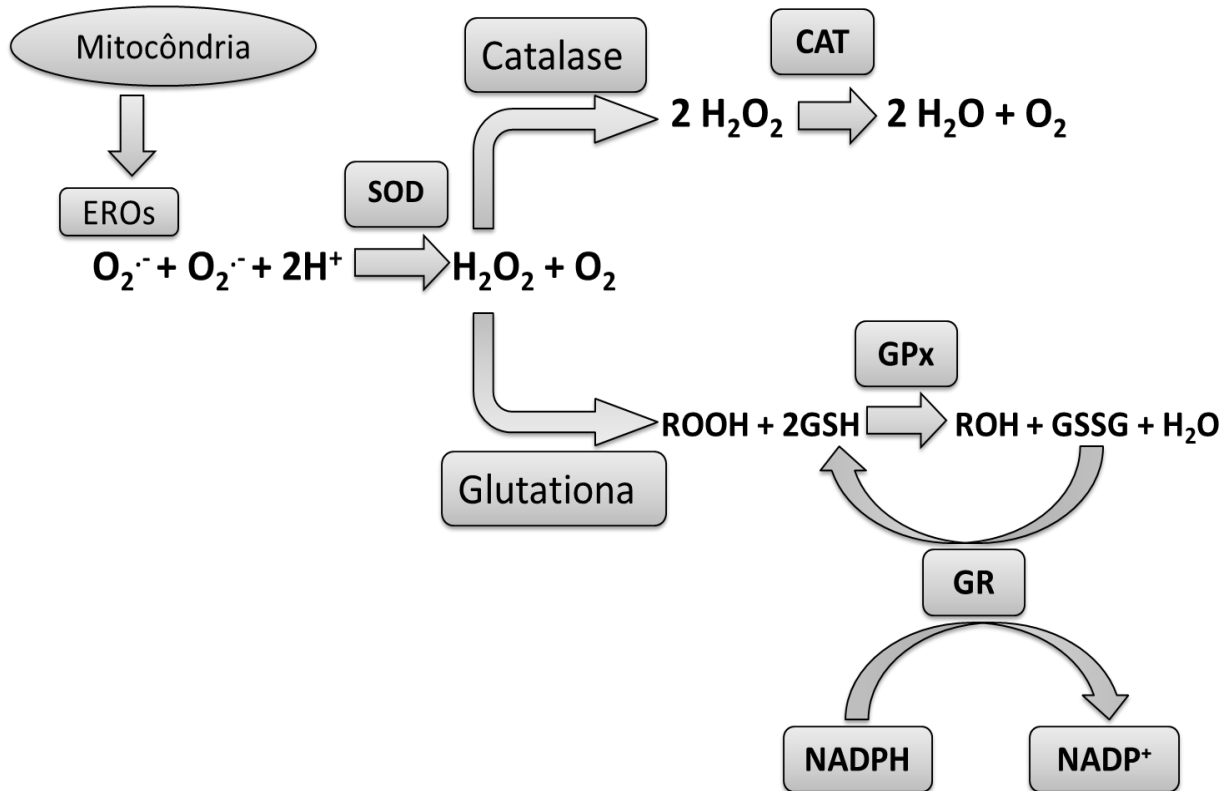


Figura 8. Resumo esquemático de parte do sistema antioxidante. As espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas naturalmente na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são controladas por sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas enzimáticos incluem as superóxido dismutases (SODs), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase dependente de selênio (Se-GPX). A glutaciona reduzida (GSH) é um importante antioxidante não-enzimático. A glutaciona é convertida da sua forma dissulfeto (GSSG) à forma reduzida (GSH) pela glutaciona redutase (GR) usando NADPH. Fonte: Stowe and Camara (2009).

2.4 ESTUDOS EM *Saccharomyces cerevisiae*.

As leveduras são microrganismos unicelulares que combinam a facilidade da manipulação genética, com a capacidade de executar todas as etapas de processamento eucarióticas (enovelamento de polipeptídios, glicosilação, metilação, acilação, e o direcionamento para os compartimentos subcelulares) sobre os polipeptídios expressos e, assim, constituem sistemas atraentes para a experimentação da biotecnologia moderna (Alberghina et al., 2012; Çelik and Çalık, 2012; Gellissen and Hollenberg, 1997).

S. cerevisiae tem sido aproveitada por milhares de anos pela humanidade na fabricação de cerveja e panificação e é considerado como um organismo GRAS (Generally Recognized As Safe), *S. cerevisiae* é um modelo eucarioto simples, e tratável geneticamente, usado em muitos esforços pioneiros, tais como técnicas de DNA recombinante,

sequenciamento sistemático do genoma, construção e análise de mutantes com genes deletados, ou definição do interactoma. Além disso, tem sido utilizado durante muito tempo como um modelo para o estudo do crescimento e divisão de células eucarióticas, bem como do metabolismo e sinalização celular (Alberghina et al., 2012; Çelik and Çalık, 2012). Durante as últimas décadas, a disponibilidade de genes estruturais relevantes e seu uso em engenharia genética tornaram-se um método fascinante para criar linhagens microbianas que podem produzir proteínas valiosas de alta qualidade e em grandes quantidades (Gellissen and Hollenberg, 1997).

A levedura *S. cerevisiae* é anaeróbica facultativa e respira na presença de oxigênio, mas fermenta sob condições anaeróbicas. A expressão de muitos genes muda quando as células experimentam concentrações variáveis de oxigênio. Isto permite que as células regulem eficientemente o metabolismo para uma das duas vias alternativas de produção de energia, respiração e fermentação (Ferreira et al., 2007). No crescimento aeróbio (via respiratória), a energia pode ser gerada através da fosforilação oxidativa e o oxigênio molecular fica disponível como um acceptor final. O uso de oxigênio nestes processos gera EROs, e a célula requer um conjunto de enzimas de proteção (Zitomer and Lowry, 1992). Além das diferenças na expressão dos genes sob as condições de estado estacionário de crescimento aeróbico e anaeróbico, as células respondem a uma diminuição da tensão de oxigênio. Existem genes que codificam funções dependentes de oxigênio, tais como subunidades do citocromo alternados e oxidases e desaturases de heme, esteróis, e da biossíntese de ácidos graxos, que são induzidos em baixa tensão de oxigênio. A expressão destes genes hipóxicos presumivelmente permite à célula utilizar o oxigênio limitado de forma mais eficiente (Zitomer and Lowry, 1992).

O dano oxidativo é de particular importância também na indústria, uma vez que a oxidação de gorduras e óleos é o processo subjacente da rancidez dos alimentos, e as células de levedura utilizadas nas indústrias de panificação e de fermentação são expostas a estresse oxidativo durante o congelamento e secagem. *S. cerevisiae* responde ao estresse oxidativo usando um número de respostas celulares que asseguram a sobrevivência da célula após exposição a agentes oxidantes. Estes incluem sistemas de defesa que desintoxicam EROs, reduzem a sua taxa de produção, e reparam os danos causados por eles. Muitas respostas são específicas para EROs, mas também há respostas de estresse gerais que normalmente são invocados por diversas condições de estresse (Morano et al., 2012; Tudek et al., 2010).

Em 2006, Braliou *et al.* fizeram a transformação de linhagens de levedura *S. cerevisiae* com o gene *hif-1* humano, para induzir a expressão do fator de transcrição HIF-1, eles identificaram algumas co-chaperonas de Hsp90 que estão envolvidas na atividade do HIF-1. Além disso, usando linhagens transformadas com genes truncados, puderam demonstrar que certas regiões de HIF-1 α atuam como mutantes negativos dominantes e podem suprimir a atividade do fator de transcrição HIF-1 (Braliou et al., 2006).

Outro estudo realizado em *S. cerevisiae* por Ferreira *et al.* (2007) teve como objetivo expressar as subunidades do fator de transcrição HIF-1 humano em linhagens transformadas com o gene *hif-1* e estudar o genoma da levedura para procurar sequências genômicas similares aos HREs. O estudo demonstrou que a *S. cerevisiae* possui algumas proteínas análogas a esse fator de transcrição, e descreveram pelo menos 24 genes com uma alta homologia com regiões HRE dos mamíferos, o que demonstra que as leveduras possivelmente possuem um fator de transcrição análogo ao HIF-1 humano (Ferreira et al., 2007).

O crescimento e a proliferação celular são processos altamente regulados, não somente em organismos multicelulares, onde a desregulação leva a neoplasias, mas também nos microrganismos, nos quais a proliferação celular desregulada pode resultar em morte celular (Fuge et al., 1994). Em organismos multicelulares, os fatores de crescimento e os hormônios são os principais reguladores da proliferação celular, enquanto que em microrganismos, tais como a levedura *S. cerevisiae*, a disponibilidade de nutrientes é o principal fator de regulação da proliferação (Fuge et al., 1994)

O crescimento da levedura *S. cerevisiae* é caracterizado por ter distintas fases, começando por um curto período de ajuste ao meio, chamado de fase de latência ou fase lag, depois as células começam uma fase de crescimento exponencial, também chamada de fase log, uma vez que a fonte de carbono da cultura se esgota, inicia uma fase de crescimento lento ou fase pos-diauxica, e finalmente as células entram na fase estacionária ou G0 que é funcionalmente definida como o tempo em que não há um aumento no número de células (Fuge et al., 1994).

As células em fase estacionária se diferenciam em formas que permitem a manutenção da viabilidade por longos períodos de tempo sem adição de nutrientes, mas mantêm a capacidade de voltar a crescer rapidamente quando os nutrientes adequados se tornarem disponíveis (Werner-Washburne et al., 1993). A exposição de células de levedura para um novo ambiente enriquecido conduz a uma resposta imediata por uma mudança de certo

número de vias bioquímicas. Como esses eventos iniciais estão relacionados com a condição fisiológica do cultivo da levedura, pode se esperar que eles reflitam o desempenho da levedura (Brejning and Jespersen, 2002).

As mudanças que ocorrem durante a fase de latência (fase lag) são caracterizadas por uma alteração global na síntese de proteínas causada pela regulação na expressão dos genes (Brejning and Jespersen, 2002). Brejning e Jespersen (2002) usando o método de 2D-PAGE, encontraram que 502 proteínas são expressas no momento de se realizar um inóculo (tempo zero) de *S. cerevisiae*. Essa quantidade aumenta para 1511 e 1533 depois de 1 e 3 horas de cultura, respectivamente. Além disso, das 502 proteínas, somente 7 são induzidas três vezes ou mais comparados com a fase respiratória tardia às 0 horas após a inoculação, mas esse número de proteínas aumenta para 124 e 126 depois de 1 e 3 horas de cultura, respectivamente. Três das proteínas induzidas durante a fase lag identificadas foram proteínas ribossomais (Asc1p, Yst1p e Yst2p), e Yk1056cp têm sido previstas para estar envolvidas na função ribossomal, cinco das proteínas estão implicadas em reações de biossíntese (Cys3p, Gdh1p, Lys9p, Sam1p e Sam2p), cinco participam na tradução (Ssb1p, Asc1p, Yst1p, Yst2p e Yk1056cp), três estão envolvidas no metabolismo de carboidratos (Hxk2p, Ald6p e Gpp1p) e uma proteína está implicada na utilização de S-adenosilmetionina (Ado1p) (Brejning and Jespersen, 2002).

As proteínas que são sintetizadas durante a fase log podem ser divididas em duas classes; aquelas que não apresentam uma repressão transitória de sua síntese na mudança diauxica (Classe I) e as que apresentam uma repressão transitória na mudança diauxica (Classe II) (Fuge et al., 1994). Boucherie (1985) encontrou aproximadamente 400 proteínas que são expressas na fase log, entre elas enolase, hexoquinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, actina aldeído desidrogenase e cinco proteínas de choque térmico (heat shock). Além disso, ele concluiu que o esgotamento da glicose é o único fator responsável pela alteração no padrão da síntese de proteínas observada durante a transição da fase log para a fase estacionária (Boucherie, 1985).

O processo de entrada na fase estacionária envolve um conjunto de eventos contínuos em resposta a um ambiente sem nutrientes. Fuge *et al.* (1985) encontraram que a maioria das proteínas sintetizadas em taxas elevadas durante a fase log, foram também produzidas durante a fase estacionária, dessas, só umas poucas proteínas foram encontradas especificamente na fase estacionária, ou mostraram incremento na sua síntese. Entre as proteínas encontradas

neste estudo estão Ssa1p, Ssa2p e Ssa3p as quais pertencem à família de proteínas heat shock 70; Hsc82p, Hsp82p, Hsp104p são chaperonas citoplasmáticas da família de proteínas Hsp90; Eno1p e Eno2p catalisam a conversão de 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato durante a glicólise, e a reação reversa durante a gluconeogênese, sua expressão é reprimida em resposta à glicose (Fuge et al., 1994).

2.4.1 Linhagens de *S. cerevisiae* usadas neste estudo.

Para a realização deste trabalho usamos três linhagens de levedura derivadas da linhagem EG103 tipo selvagem (EG103WT) (*MAT α, leu2-3,11 his3Δ1 trp-289a, ura3-52*). As características das linhagens foram as seguintes: EG103M2 como EG103WT contendo apenas vetores vazios pelo qual não expressa nenhuma proteína, foi usada como controle negativo; EG103 $\alpha\beta$ contém os vetores de expressão das duas subunidades do gene *hif-1* humano (HIF-1 α e HIF-1 β (ARNT)), nessa linhagem as duas subunidades são totalmente funcionais e conservam a capacidade de formar o dímero de HIF-1 humano, e a última linhagem EG103 $\alpha\Delta\beta$ expressa as duas subunidades do gene *hif-1* humano (HIF-1 α e HIF-1 β (ARNT)), mas a subunidade HIF-1 β se encontra truncada, pelo qual as duas partes não conseguem formar o dímero HIF-1 e a proteína não é funcional. A descrição detalhada das linhagens se encontra na Tabela 2, e os vetores na Tabela 3 dos Materiais e Métodos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta ao estresse oxidativo das linhagens de leveduras EG103 $\alpha\beta$ e EG103 $\alpha\Delta\beta$ que expressam HIF-1 humano, e da linhagem EG103M2 (Mock).

3.1.1 Objetivos específicos

- ✓ Analisar o crescimento das linhagens de levedura em meio seletivo, na ausência ou presença de H₂O₂ e outros agentes estressores.
- ✓ Avaliar o crescimento das linhagens de levedura em meio seletivo, na presença de H₂O₂ e diferentes agentes inibidores.
- ✓ Medir a atividade da SOD em células expostas a H₂O₂.
- ✓ Medir as concentrações de glutathiona total (GSH-eq), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona dissulfeto (GSSG) e razão GSSG/GSH-eq

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados possuíam grau analítico adequado. As substâncias foram adquiridas a diversos fornecedores: a Glicose, e os aminoácidos uracila, histidina, adenina, metionina, leucina, triptofano, assim como o Sulfato de amônio ((NH₄)₂ SO₄), dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH), fenazina metossulfato (PMS), azul de nitrotetrazólio (NBT), ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), superóxido dismutase (SOD), fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF), Menadiona (MD), hidroperóxido de cumene (CHP), hidroperóxido terc-Butil (t-BHP), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 2-vinilpiridina (2-VP), inibidor de proteasoma (Z-LLF-CHO), dimetilsulfóxido (DMSO), L-Butionina-S, R-Sulfoximina (BSO), 3-amino 1,2,4-triazole (ATZ), Deferoxamina (DFO), Glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), glutathiona redutase (GR) e o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) eram da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); o potássio fosfato monobásico, potássio fosfato dibásico e o etanol eram da J.T. Baker; a base nitrogenada de levedura (YNB) era da DIFCO Laboratories; o cianeto de potássio (KCN) e o ácido tricloroacético (TCA) eram da MERCK; o dodecil sulfato de sódio (SDS) era da Affymetrix e o inibidor de protease (cOmplete, Mini EDTA-Free; Roche) da Roche.

4.2 LINHAGENS DE LEVEDURAS

As linhagens de leveduras transformadas com plasmídeos contendo os genes que codificam as subunidades alfa e beta do fator de transcrição HIF-1 humano foram produzidas no Laboratório de Biologia Molecular da UnB pelo Grupo de Pesquisa em Estresse Oxidativo. Estas linhagens foram usadas no presente estudo e estão detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2. Linhagens de leveduras usadas neste estudo.

Linhagem	Vetores de expressão	Observação
EG103M2 (Mock 2)	Y1PGK + pYPGE2	Controle negativo
EG103$\alpha\beta$	Y1PGK α + pY2ARNT	Expressões do HIF-1 α e HIF-1 β (ARNT) confirmadas
EG103$\alpha t\beta$	Y1PGK α + pYtARNT	Expressão do HIF-1 α confirmada e tARNT mRNA
EG103WT (Tipo selvagem)	Não Transformada	Controle negativo

A expressão do HIF-1 α e HIF-1 β (ARNT) foi detectada nas linhagens recombinantes através de ensaios de Western Blot. As linhagens não transformadas ou transformadas apenas com os vetores vazios (células mock) serão usadas como controles negativos nos ensaios.

A descrição dos vetores mostrados na tabela 2 aparece na Tabela 3.

Tabela 3. Vetores obtidos após subclonagem das subunidades do HIF-1 nos vetores de expressão de *S. cerevisiae*.

Vetores	Sistema	Marca auxotrófica	Meio seletivo
Y1PGK	Só vetor	<i>LEU2</i> (Leucina)	SC leu ⁻
pYPGE2	Só vetor	<i>TRP1</i> (Tryptofano)	SC trp ⁻
Y1PGKα	Y1PGK + HIF-1 α	<i>LEU2</i> (Leucina)	SC leu ⁻
pYtARNT	pYPGE2 + tARNT	<i>TRP1</i> (Tryptofano)	SC trp ⁻

Estão relacionados os vetores e os meios seletivos utilizados para obter as células de leveduras recombinantes. tARNT- Gene que codifica a subunidade beta do HIF-1 porém com sua sequência truncada, sem a região *helix-loop-helix* e a região de aminoácidos básicos.

4.3 Curva de crescimento das linhagens de levedura sob condições de normóxia.

Para estudar o efeito da expressão do fator de transcrição HIF-1 nas células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* se realizou uma curva de crescimento das três linhagens transformadas, EG103M2 (Mock), EG103 $\alpha\beta$ e EG103 $\alpha\Delta\beta$ em normóxia (condições de oxigênio normais, pO₂ 40 a 50 mmHg).

As células de levedura das três linhagens transformadas (EG103M2 (Mock 2), EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$) foram crescidas em meio mínimo SCL⁻T⁻ (YNB 0,67% (p/v), (NH₄)₂ SO₄ 0,5% (p/v) e Glicose 2% (p/v)) seletivo, suplementos e aminoácidos específicos foram adicionados quando necessário de acordo com Kaiser et al (1994), os seguintes componentes do meio de cultura foram utilizados numa concentração 4 vezes maior do que as propostas por esses autores (Uracila 80 mg/mL, Metionina 80 mg/mL, Histidina 80 mg/mL e Adenina 20 mg/mL), para evitar a limitação do crescimento pelo seu esgotamento (Gralla and Valentine, 1991).

Células crescidas sob agitação a 200 rpm e 28 °C, foram diluídas em meio SCL⁻T⁻ seletivo, para se obter uma OD (Densidade Ótica 600 nm) de 0,1. 50 mL de cada cultura foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL, a partir desse momento (Tempo de crescimento 0), o crescimento das células foi medido cada duas horas nas primeiras 6 horas, e depois de novo desde a hora 14 até a hora 26, o último ponto foi tomado às 38 horas de crescimento.

4.4 Curva de crescimento das linhagens de levedura sob condições de estresse oxidativo.

Células de três linhagens de levedura (EG103M2 (Mock 2), EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$) crescidas sob agitação a 200 rpm e 28 °C, foram diluídas em meio líquido mínimo sintético sem Leucina nem Triptofano (meio SCL⁻T⁻) (YNB 0,67% (p/v), (NH₄)₂ SO₄ 5% (p/v) e Glicose 2% (p/v) + aminoácidos (Adenina, Uracila, Metionina, Histidina)) seletivo, para se obter uma OD (600 nm) de 0,5. Uma quarta linhagem (EG103WT (Wild Type)) foi testada também, essa foi crescida sob agitação a 200 rpm e 28 °C, em meio líquido mínimo sintético (meio SC) (5% de YNB 20X, 2% de glicose, 0,008% de uracila, 0,008% de adenina, 0,008%

de metionina, 0,008% de histidina, 0,04% de leucina, 0,008% de triptofano e 70,6% de água destilada estéril.) Depois se tomaram 5,6 mL das culturas de levedura com OD de 0,5, e se realizou uma nova diluição com 7,7 mL de meio SCL^{-T⁻} ou meio SC, de acordo a cada linhagem. O controle negativo foi diluído em 8,4 mL de meio SCL^{-T⁻} ou SC, finalmente adicionaram-se 0,7 mL de H₂O₂, para atingir concentrações finais de 100 µM, 250 µM, 500 µM e 1 mM, o volume final foi de 14 mL, o controle negativo foi a cultura sem H₂O₂. A OD final foi de 0,2, essas culturas foram divididas em alíquotas de 2 mL. A partir desse momento (Tempo de crescimento 0), o crescimento das células foi medido a cada hora durante 6 horas.

4.5 Medições da atividade de SOD

4.5.1 Exposição de células ao Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂).

As células das linhagens de levedura EG103M2 (Mock 2), EG103αβ e EG103αβ foram crescidas sob agitação (200 rpm) por 48 horas em meio mínimo SCL^{-T⁻} (YNB 0,67% (p/v), (NH₄)₂ SO₄ 0,5% (p/v) e Glicose 2% (p/v) + aminoácidos (Adenina, Uracila, Metionina, Histidina)) seletivo, para se obter uma OD (600 nm) maior de 0,7, isto para obter a maior quantidade de células possível. Depois das 48 horas, as culturas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 mL de Tampão fosfato [50 mM], pH 7,2, todo o processo foi feito na câmara de fluxo laminar. A OD de todas as culturas foi levada para 0,7, e foram tratadas com H₂O₂ para uma concentração final de 1 mM. As culturas foram incubadas mais uma hora nas mesmas condições (28 °C, shaker 200 rpm). Passada uma hora, as células foram coletadas da seguinte forma: Centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, e se realizaram duas lavagens mais com água destilada, finalmente as células foram congeladas a -20 °C. Posteriormente as células foram utilizadas para o preparo de extrato proteico para medir a atividade da superóxido dismutase (SOD).

4.5.2 Preparo do extrato proteico para medir a atividade de SOD.

As células previamente coletadas e congeladas foram pesadas e ressuspensas em Tampão fosfato [0,1 mM], pH 7,2, contendo inibidor de protease (cOmplete, Mini EDTA-Free; Roche) com uma concentração 1X, em uma relação de 0,45 mL por cada 0,1 g de células. Após isto, foram adicionadas “glass beads” em uma relação de 0,45 g por cada 0,1 g de células. A extração foi feita durante 30 minutos em ciclos de 30 segundos no gelo e 30 no vortex, depois de terminados todos os ciclos o sobrenadante foi transferido para microtubos novos previamente congelados, e em seguida foram centrifugados a 4 °C, por 40 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido novamente para microtubos novos e congelados. O extrato proteico foi congelado imediatamente a -20 °C, para ser usado em experimentos posteriores.

4.5.3 Medição da atividade de SOD em microplaca.

Para medir a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), foi feita uma reação onde se produz a geração de radical superóxido em um sistema não enzimático: a fenazina metossulfato (PMS) é reduzido pelo NADH e reage com o oxigênio, formando o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), este a sua vez é capaz de doar um elétron ao azul de nitrotetrazólio (NBT), reduzindo-o a formazano, que apresenta um máximo de absorção a 560 nm. O potencial antioxidante de compostos ou extratos é avaliado através da capacidade para competir com o NBT pelo radical superóxido gerado (Ewing and Janero, 1995).

A medição da atividade de SOD foi feita em microplaca de 96 poços usando um espectrofotômetro VersaMax™ Absorbance Microplate Reader. O protocolo foi baseado no artigo de Ewing e Janero (Ewing and Janero, 1995). O sistema de reação completo (250 µL volume final) consistia de 200 µL de tampão fosfato [50 mM], pH 7,4, com 0,1 mM de EDTA, 62 µM de Nitroblue Tetrazolium (NBT), 98 µM de NADH preparado na hora, depois era adicionado 25 µL da amostra (SOD comercial ou extrato proteico), a reação foi iniciada com a adição de 25 µL de fenazina metossulfato (PMS) 33 µM preparado em tampão fosfato [50 mM], pH 7,4, com 0,1 mM de EDTA. As concentrações finais dos reagentes foram 50 µM de NBT, 78 µM de NADH e 3,3 µM de PMS. A absorbância a 560 nm foi medida por 5

minutos como um índice da redução no NBT. O controle foi feito com todos os reagentes exceto o PMS. Para discriminar entre Cu,Zn-SOD e Mn-SOD, foi adicionado Cianeto de potássio (KCN) em uma concentração final de 15 mM o qual inibe totalmente a ação de Cu,Zn-SOD (Ewing and Janero, 1995).

4.6 Exposição das células de levedura a agentes estressantes em microplaca.

Para a exposição das células de levedura a distintos agentes estressores foi usada uma placa de 96 poços, não foram usados os poços das bordas para evitar o efeito de borda no crescimento das células. Os agentes estressores usados foram Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), Hidroperóxido de Cumene (CHP) e terc-Butil Hidroperóxido (t-BHP), todos preparados em água. A Menadiona (MD) foi preparada em Etanol 96%, de tal forma que a concentração final na cultura não excedera 1%. Células crescidas sob agitação a 200 rpm e 28 °C, foram diluídas em meio SCL-T⁻ (YNB 0,67% (p/v), (NH₄)₂ SO₄ 5% (p/v) e Glicose 2% (p/v) + aminoácidos (Adenina, Uracila, Metionina, Histidina)) seletivo. As células foram ressuspendidas em meio seletivo para uma OD de 1, isto para obter uma OD final na placa de 0,2. Foram adicionados 140 µL desta cultura em cada poço e logo eram adicionados 10 µL de cada um dos agentes estressores (150 µL volume final). Foram feitas 4 soluções de trabalho para atingir as diferentes concentrações desejadas. As concentrações finais foram 10, 25, 50 e 250 µM para a Menadiona, Hidroperóxido de Cumene e terc-Butil Hidroperóxido. As concentrações finais do Peróxido de Hidrogênio foram 0,25, 0,5, 1 e 2 mM. Como Controle negativo, foi usado 10 µL de meio seletivo para o Peróxido de Hidrogênio, Hidroperóxido de Cumene e terc-Butil Hidroperóxido, o controle para a Menadiona foi etanol diluído para ficar a uma concentração final menor a 1%. Finalmente, as placas eram cobertas com selo adesivo transparente para evitar que a cultura fosse contaminada. O crescimento das células foi monitorado por 8 horas a 600 nm no modo cinética do espectrofotômetro VersaMax™ Absorbance Microplate Reader. O crescimento das culturas foi medido como a diferença entre o último e o primeiro ponto de leitura.

4.7 Exposição das células de levedura a H₂O₂ e inibidores em microplaca.

Depois de avaliar o crescimento das células na presença de vários agentes oxidantes, decidimos testar o crescimento das linhagens na presença de alguns agentes inibidores. Para isso escolhemos 4 substâncias que possuem alvos específicos, 3-amino 1,2,4-triazol (ATZ) que age como um inibidor específico da Catalase, L-Butionina-S, R-Sulfoximina (BSO) o qual é um depletor da Glutathione por inibição da gama-glutamilcisteína sintetase, o composto quelante de ferro Deferoxamina (DFO) e o Inibidor de proteasoma (Z-LLF-CHO) o qual inibe a atividade do tipo quimotripsina (CHT-L) do complexo proteinase multicatalítico.

Para a exposição das células de levedura a agentes estressores e inibidores, foi usada uma placa de 96 poços, não foram usados os poços das bordas para evitar o efeito de borda no crescimento das células. Células crescidas durante a noite sob agitação a 200 rpm e 28 °C, foram diluídas em meio SCL⁻T⁻ (YNB 0,67% (p/v), (NH₄)₂ SO₄ 5% (p/v) e Glicose 2% (p/v) + aminoácidos (Adenina, Uracila, Metionina, Histidina)) seletivo. As células foram ressuspensas em meio seletivo para uma OD de 1, isto para obter uma OD final na placa de 0,2. Foram usadas 4 concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (0,25, 0,5, 1 e 2 mM, previamente testadas em outros experimentos) como agente estressor, os inibidores usados foram 3-Amino-1,2,4-triazole (ATZ), L-butionina-S, R-sulfoximina (BSO), Deferoxamina (DFO), preparados em água destilada, e Inibidor de Proteasoma (Z-LLF-CHO) preparado em DMSO. Foram usadas 3 concentrações de BSO e ATZ 2, 5 e 10 mM. Para Z-LLF-CHO usamos 20, 30 e 75 µM. Como controle negativo foi usada água destilada para o ATZ, BSO e DFO. O controle negativo do Z-LLF-CHO foi DMSO. O crescimento das células foi monitorado por 8 horas a 600 nm no modo cinética do espectrofotômetro VersaMax™ Absorbance Microplate Reader, exceto para o Z-LLF-CHO, onde o crescimento foi medido por 18 horas, pois percebemos que o DMSO produzia uma parada no crescimento. As placas eram cobertas com selo adesivo transparente para evitar que a cultura fosse contaminada. O crescimento das culturas foi medido como a diferença entre o último e o primeiro ponto de leitura.

4.8 Medida dos níveis de Glutathiona.

4.8.1 Preparo do extrato proteico para medir a atividade de Glutathiona total (GSH-eq) e oxidada (GSSG).

Células crescidas sob agitação a 200 rpm e 28 °C, em meio SCL⁻T⁻ (YNB 0,67% (p/v), (NH₄)₂ SO₄ 5% (p/v) e Glicose 2% (p/v) + aminoácidos (Adenina, Uracila, Metionina, Histidina)) seletivo, foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a uma concentração 1 mM por 1 hora, depois foram coletadas e congeladas para o preparo do extrato proteico. As células previamente coletadas e congeladas foram pesadas e ressuspensas em 4X volume de água (contendo Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF), concentração final [1 mM]) e 5X volume de TCA 20%, a concentração final do TCA foi 10%. Após isto, foram adicionadas glass beads em uma relação de 0,45 g por cada 0,1 g de células. A extração foi feita durante 30 minutos em ciclos de 30 segundos no gelo e 30 no vortex, depois de terminados todos os ciclos, o sobrenadante foi transferido para microtubos novos previamente congelados, e posteriormente foram centrifugados a 4 °C, por 40 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido novamente para microtubos novos e congelados. O extrato celular foi congelado imediatamente a -20 °C, por não mais de duas horas para medir os níveis de glutathiona total (GSH-eq) e oxidada (GSSG).

4.8.2 Medição de Glutathiona total (GSH-eq) e oxidada (GSSG).

Para determinar os níveis de equivalentes de glutathiona (GSH-eq) e de glutathiona dissulfeto (GSSG) foi usado o método enzimático com algumas modificações (Welker, 2009). O método é baseado na reação entre GSH e o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, Reagente de Ellman), esta é utilizada como método de referência para monitorar-se a quantidade de GSH, avaliada pela absorvância a 412 nm, dado que o produto resultante é o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de cor amarela. A reação é feita em um meio reacional contendo também NADPH e Glutathiona redutase (GR) (Figura 9). A reação é da seguinte forma:

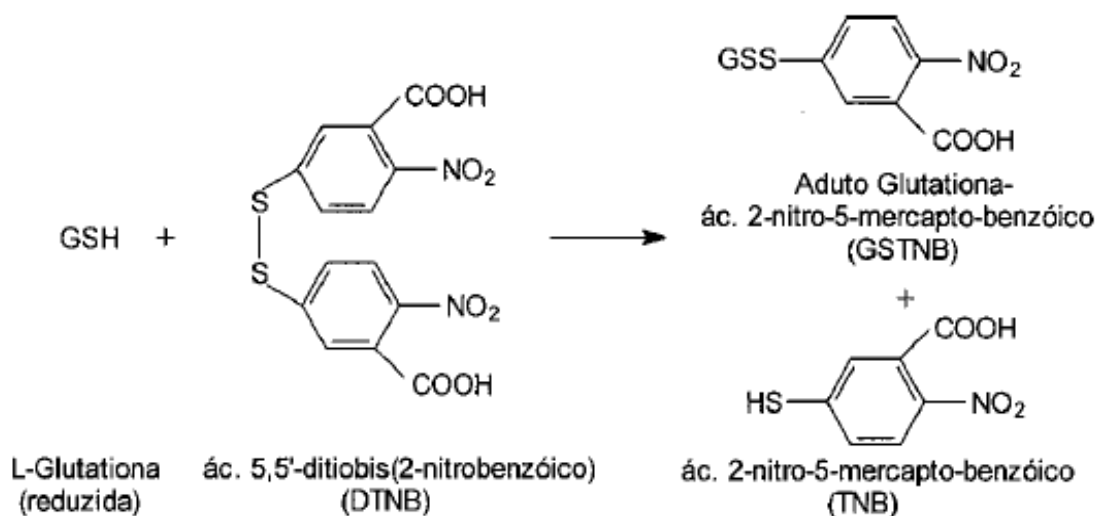
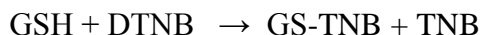


Figura 9. Reação entre glutaciona reduzida e DTNB (reagente de Ellman). Fonte: Rover Júnior *et al.* (2001)

A velocidade da alteração da absorbância em 412 nm é linearmente proporcional à concentração total de glutaciona, e devido à presença de GR, o conteúdo total de glutaciona se encontra no estado reduzido (GSH). A glutaciona dissulfeto formada (GSSG) pode ser reciclada a GSH pela GR na presença de NADPH. Para medir a concentração de GSSG nas amostras estas são incubadas com 2-vinilpiridina (2-VP) que se liga e inibe à GSH (Griffith, 1980).

Antes de medir as concentrações de GSH-eq e de GSSG nas amostras, foram feitas duas curvas padrão com diferentes concentrações de GSH. A curva padrão para medir a concentração de GSH-eq varia em concentrações desde 0,0 até 1,5 μM , a reação é feita num meio reacional contendo 100 mM tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM EDTA, 0,238% (p/v) TCA, 0,1 mM NADPH, 0,1 mM DTNB e 0,05 U/mL GR. A curva padrão para medir a concentração de GSSG tinha concentrações de GSH entre 0,0 e 0,2 μM , o meio reacional continha 100 mM tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM EDTA, 0,238% (p/v) TCA, 0,1 mM NADPH, 0,1 mM DTNB e 0,3 U/mL GR. A reação é iniciada pela adição de GR e a absorbância foi medida a 412 nm por 1 minuto. Cada ponto da curva foi feito em triplicata em cuvetas de plástico.

Para medir a concentração de GSH-eq e de GSSG nas amostras tomaram-se alíquotas dos extratos, 100 μL de cada extrato foram transferidos para dois tubos diferentes. No tubo para medir GSH-eq foram adicionados 300 μL de tampão fosfato 0,5 M (pH 7,0) e 20 μL de Etanol (96 %), nos tubos para medir GSSG foram adicionados 300 μL de tampão fosfato 0,5

M (pH 7,0) e 20 μ L de 2-VP (0,5 M) em etanol. Os tubos foram agitados vigorosamente em vortex e incubados por uma hora em temperatura ambiente no escuro. Passada uma hora a concentração de GSH-eq e de GSSG nas amostras foi medido a 412 nm por 1 minuto. As medidas foram feitas em triplicata em cuvetas de plástico. A Absorbância ($\Delta A_{412}/\text{min}$) das amostras foi comparada com as curvas padrão e a concentração de GSH-eq e GSSG calculadas em nmol/mg de proteína. A concentração de GSH propriamente dita foi obtida pela subtração GSH-eq - GSSG e a razão GSSG/GSH-eq pela divisão entre os valores.

4.9 Proteínas solúveis totais

Para os cálculos da atividade enzimática específica, a concentração de proteínas solúveis totais nos extratos foi determinada pela reação das proteínas com o reagente coomassie brilliant blue G-250 (Bradford, 1976). Inicialmente se realizou uma curva padrão, em cuvetas de plástico, usando albumina de soro bovino (BSA, 1 mg/mL) em concentrações de 0 até 20 μ g de proteína, para realizar a curva foram adicionados volumes variáveis de BSA (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 15, 17,5, 20 μ L) para alcançar as concentrações desejadas, e foi completado até 100 μ L com água destilada, finalmente se adicionou 1 mL do reagente de Bradford (Tabela 4). Logo após os reagentes foram misturados e a absorbância a 595 nm foi medida em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1800, depois de 2 minutos e antes de 10, para evitar a precipitação das proteínas e erros na leitura. Todos os pontos foram feitos em triplicata. Para medir a quantidade de proteínas nos extratos, se tomou um volume de 20 μ L de cada extrato com uma diluição 1:500 (p/v), e se fez o mesmo protocolo da curva padrão. Todas as medidas foram feitas em triplicata. O cálculo da concentração de proteínas nos extratos foi feito comparando a absorbância das amostras com a curva-padrão.

Tabela 4. Curva padrão do ensaio de Bradford

Número de amostra	µg de proteína	Solução padrão de BSA (1 mg/mL)	Tampão do experimento (depende de cada extrato)	Reagente de Bradford (mL)
1	0 µg	0 µL	100 µL	1 mL
2	2,5	2,5	97,5	1
3	5	5	95	1
4	7,5	7,5	92,5	1
5	10	10	90	1
6	12,5	12,5	87,5	1
7	15	15	85	1
8	17,5	17,5	82,5	1
9	20	20	80	1

Cada ponto deve ser feito em triplicata.

4.10 Análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software livre BioEstat 5.3, se realizaram testes de ANOVA e o teste Dunnett's para comparação entre dois ou mais pontos. Os ensaios foram realizados com repetição em triplicata (N=3) e os dados foram descritos com o valor da média e erro padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Crescimento das linhagens de levedura em normóxia.

O crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* EG103M2, EG103 $\alpha\beta$ e EG103 $\alpha\Delta\beta$ sob normóxia (Fig. 10) mostrou que a linhagem EG103 $\alpha\beta$ teve um crescimento menor em comparação com a linhagem controle EG103M2. Durante as primeiras 4 horas de crescimento (fase Lag), as densidades óticas (ODs) das três linhagens foram similares (OD_{600nm} : EG103M2 = $0,153 \pm 0,006$, EG103 $\alpha\beta$ = $0,148 \pm 0,006$ e EG103 $\alpha\Delta\beta$ = $0,163 \pm 0,017$) e não apresentaram diferença significativa. Depois das 16 horas durante a fase exponencial (fase Log) se observou uma diferença significativa entre a linhagem EG103 $\alpha\beta$ e a linhagem EG103M2 (OD_{600nm} : EG103M2 = $1,91 \pm 0,079$, EG103 $\alpha\beta$ = $1,363 \pm 0,024$) ($p < 0,01$), o mesmo resultado foi obtido às 18 horas (OD_{600nm} : EG103M2 = $2,16 \pm 0,112$, EG103 $\alpha\beta$ = $1,72 \pm 0,060$) ($p < 0,01$), 22 horas (OD_{600nm} : EG103M2 = $2,53 \pm 0,128$, EG103 $\alpha\beta$ = $1,92 \pm 0,145$) ($p < 0,05$). Finalmente às 38 horas (fase estacionária) (OD_{600nm} : EG103M2 = $3,04 \pm 0,076$, EG103 $\alpha\beta$ = $2,59 \pm 0,132$) ($p < 0,05$) também se encontrou diferença estatística significativa entre o crescimento das linhagens.

Quando analisamos o crescimento da linhagem de levedura EG103 $\alpha\beta$ em comparação com a linhagem EG103 $\alpha\Delta\beta$ observamos que o crescimento da linhagem EG103 $\alpha\Delta\beta$ foi similar ao crescimento da linhagem EG103M2, porém não apresentou diferença significativa em relação ao crescimento da linhagem EG103 $\alpha\beta$ em nenhuma das horas testadas (Fig. 10).

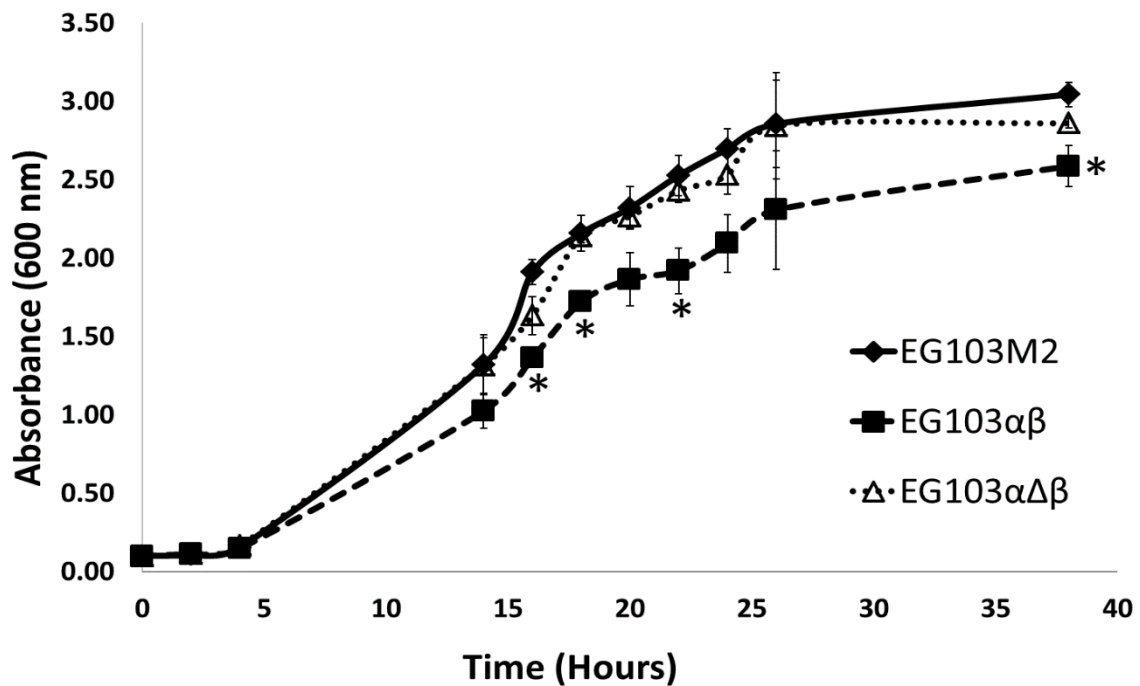


Figura 10. Curva de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae*, EG103M2, EG103αβ e EG103αΔβ sob condições de normóxia. Células crescidas em condições normóxia, densidade ótica (OD_{600 nm}) inicial de 0,1. A OD_{600nm} das culturas foi medida em diferentes horas e fases de crescimento. O experimento foi repetido três vezes, em dias diferentes. N=3. Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média. Encontrou-se diferença significativa ($p < 0,05$) no crescimento da linhagem EG103αβ em comparação à linhagem controle (EG103M2) em diferentes horas. *Diferença estatística significativa $p < 0,05$.

5.2 Análise do crescimento das linhagens de levedura em meio seletivo SCL⁻T⁻ na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Todas as linhagens de levedura apresentaram susceptibilidade à maior concentração de H₂O₂ testada (1 mM) com uma diferença significativa em relação a seus controles ($p < 0,01$) (Fig. 11). As linhagens EG103WT e EG103αΔβ apresentaram uma susceptibilidade similar a três das quatro concentrações testadas (250 μM, 500 μM e 1 mM de H₂O₂). As linhagens EG103M2 e EG103αβ só apresentaram susceptibilidade significativa à concentração maior (1 mM). Na fig. 11, nota-se também que o crescimento da linhagem EG103αβ é menor em relação à linhagem selvagem (EG103WT).

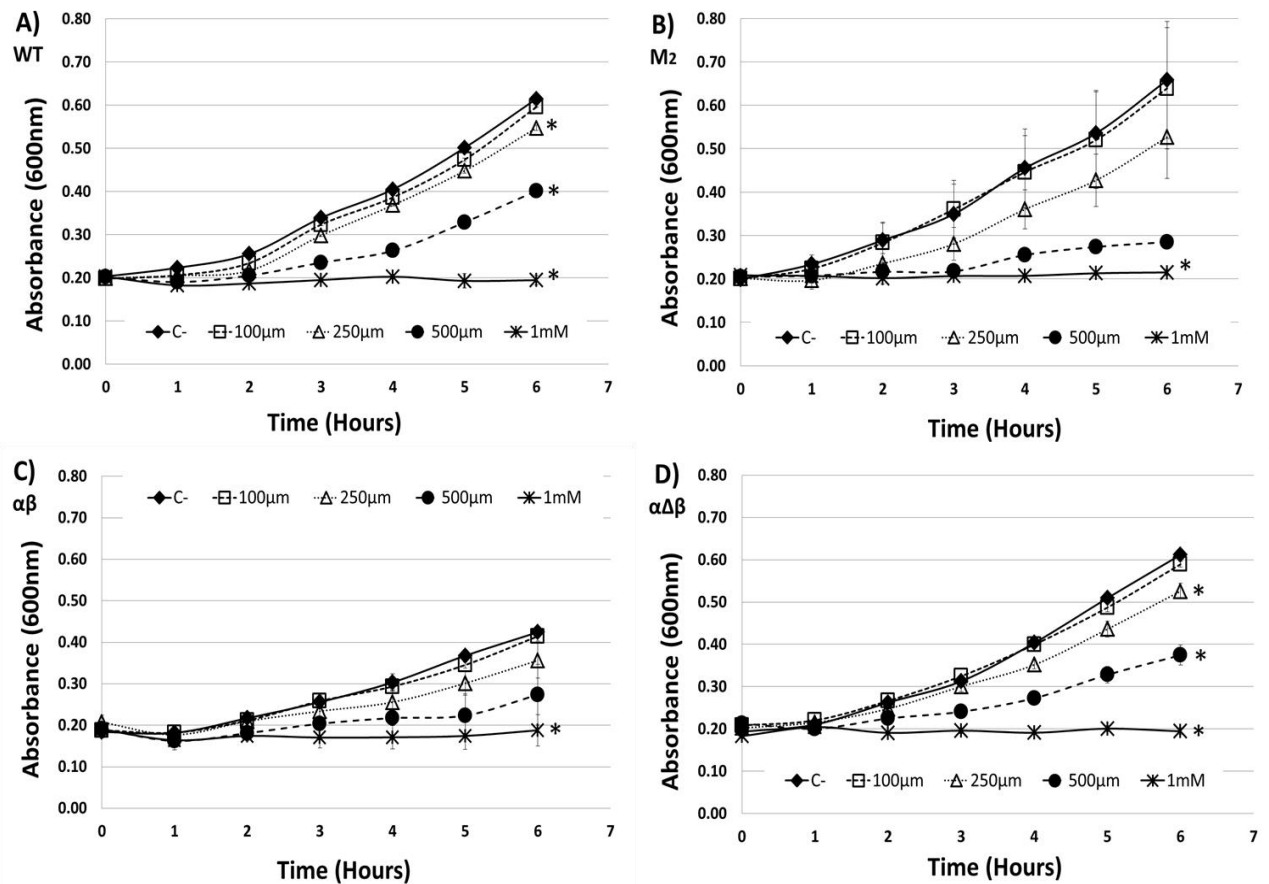


Figura 11. Curva de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* EG103WT (A), EG103M2 (B), EG103 $\alpha\beta$ (C) e EG103 $\alpha\Delta\beta$ (D) na presença H_2O_2 . Foram feitas culturas de cada linhagem celular, o inóculo foi diluído para uma $OD_{600\text{ nm}}$ final de 0,2. As culturas foram tratadas com concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (H_2O_2): 100 μm (\square), 250 μm (Δ), 500 μm (\bullet) e 1 mM (\ast). As amostras controle (\blacklozenge) foram tratadas com meio SCLT no lugar do H_2O_2 , e finalmente foram divididas em alíquotas de 2 mL. O crescimento das leveduras foi monitorado a 600 nm a cada hora por um período de 6 horas, começando no tempo zero (0). Os experimentos foram repetidos três vezes, em dias diferentes dias. N=3. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média. *Diferença estatística significativa em comparação com os controles ($p < 0,05$).

Uma vez que a linhagem EG103 $\alpha\beta$ apresentou um crescimento menor que as outras linhagens testadas, não foi possível comparar as curvas de crescimento, por isso analisamos os dados e mostramos a porcentagem de crescimento das células comparadas com seus controles (o crescimento dos controles foi considerado 100 %) (Figura 12).

O resultado desta análise mostrou que existe uma diferença significativa entre a porcentagem de crescimento do controle (100 %) da linhagem EG103WT e as células tratadas com 250 μM (89,04 %), 500 μM (65,29 %) e 1 mM (31,67 %) de H_2O_2 . A linhagem EG103M2 mostrou diferença nas duas concentrações maiores, 500 μM (43,31 %) e 1 mM (32,67 %), o dado mais importante foi a porcentagem de crescimento da linhagem EG103 $\alpha\beta$, a qual só apresentou diferença significativa com a concentração máxima de H_2O_2 testada 1

mM (44,30 %). Por fim, linhagem EG103 $\alpha\Delta\beta$ apresentou diferença significativa com três concentrações testadas, 250 μ M (85,94 %), 500 μ M (61,19 %) e 1 mM (31,77 %). Encontrou-se uma diferença entre os grupos de tratamento (H_2O_2), mas não entre as linhagens de levedura, ainda assim se observa que na maior concentração de H_2O_2 a linhagem EG103WT teve uma queda no seu crescimento de 68,33 % enquanto que a linhagem EG103 $\alpha\beta$ teve uma queda de 55,7 %, indicando que a presença do HIF-1 pode estar protegendo as células do dano oxidativo. .

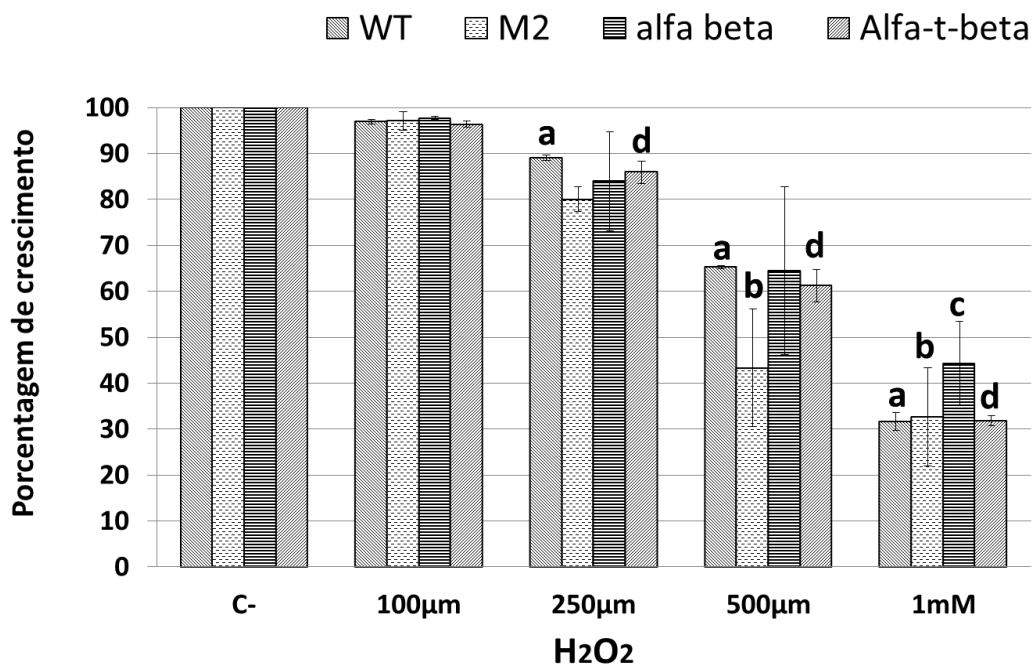


Figura 12. Porcentagem de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* EG103WT, EG103M2, EG103 $\alpha\beta$ e EG103 $\alpha\Delta\beta$ na presença de H_2O_2 . Os dados obtidos durante o experimento de análise do de crescimento foram analisados para mostrar a porcentagem de crescimento de cada linhagem em relação a seu controle (crescimento 100 %). O experimento foi repetido três vezes, em dias diferentes dias. N=3. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média. Encontrou-se diferença significativa entre os diferentes tratamentos, mas não entre as linhagens de leveduras. ^(a,b,c,d)Diferença estatística significativa em comparação com o controle ($p < 0,05$).

5.3 Crescimento em microplaca das linhagens de levedura em meio seletivo SCL⁻T⁻ na presença de agentes oxidantes.

Depois de analisar o crescimento das linhagens de levedura na presença de H₂O₂, também realizamos experimentos de crescimento em microplaca com outros agentes oxidantes tais como menadiona (MD), hidroperóxido de cumene (CHP) e terc-butil hidroperóxido (t-BHP). Os resultados estão apresentados como o delta de crescimento (diferença entre o último e o primeiro ponto medido) das linhagens (Figura 13).

O crescimento das linhagens EG103αβ e EG103M2 tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂ foi maior que o crescimento de seus respectivos controles (Fig. 13A) na concentração de 0,25 mM (p<0,05). Quando as três linhagens foram tratadas com 1 ou 2 mM de H₂O₂ o crescimento diminuiu em todas elas com diferença estatisticamente significativa (p<0,05). Porém, quando as linhagens foram tratadas com 0,5 mM de H₂O₂, nenhuma das linhagens apresentou diferença em comparação aos controles.

Quando as células foram tratadas com concentrações variáveis de menadiona (MD) (0, 10, 25, 50 e 250 μM) (Fig. 13B), as linhagens EG103αΔβ e EG103M2 apresentaram um crescimento menor que seus controles na concentração de 50 μM (p<0,05), mas a linhagem EG103αβ teve um crescimento similar ao controle, indicando uma menor sensibilidade à MD. Todas as linhagens mostraram sensibilidade na maior concentração testada (250 μM).

Depois de tratar as linhagens com hidroperóxido de cumene (CHP) (Fig. 13C) percebemos que todas as linhagens apresentam baixa sensibilidade às concentrações testadas (0, 10, 25, 50 e 250 μM), exceto pela linhagem EG103αβ, a qual apresentou uma diminuição significativa (p<0,05) no seu crescimento comparada com seu controle na concentração máxima testada (250 μM), o que indica uma maior sensibilidade a este composto.

Já quando as linhagens foram tratadas com terc-butil hidroperóxido (t-BHP) (Fig. 13D) a diferentes concentrações (0, 10, 25, 50 e 250 μM), somente a linhagem EG103αΔβ apresentou um crescimento menor que seu controle (p<0,05) na concentração 25 μM. As três linhagens mostraram um crescimento menor (p<0,05) que seus controles nas concentrações de 50 e 250 μM.

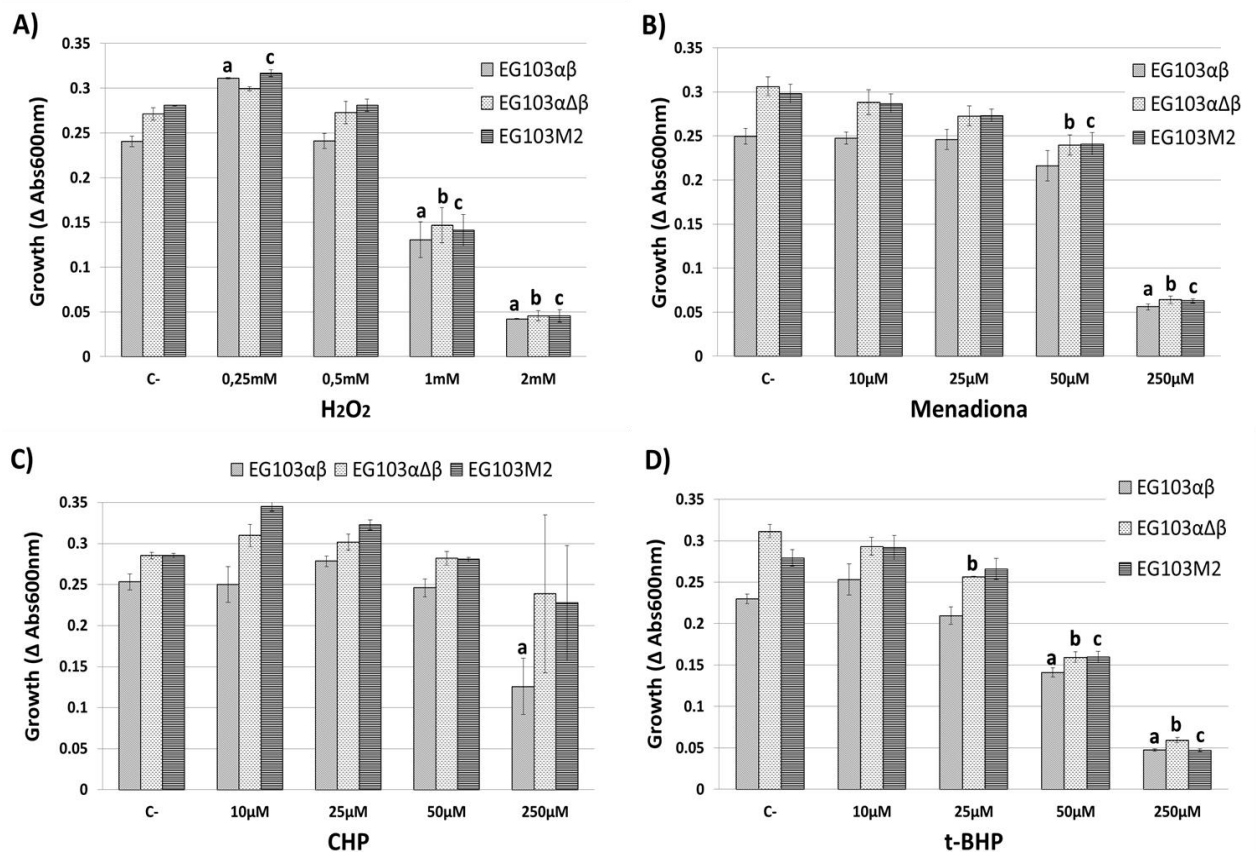


Figura 13. Crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* EG103αβ, EG103αΔβ e EG103M₂ na presença de agentes estressores. Pré-inoculos de cada uma das linhagens de levedura foram diluídos para uma OD_{600 nm} final de 1 e foram feitas culturas em microplaca, com um volume final de 150 μL. Todas as culturas foram tratadas com concentrações crescentes de H₂O₂ (0, 0,25, 0,5, 1 e 2 mM) (A), menadiona (MD) (0, 10, 25, 50 e 250 μM) (B), hidroperóxido de cumene (CHP) (0, 10, 25, 50 e 250 μM) (C) e Terc-butyl hidroperóxido (t-BHP) (0, 10, 25, 50 e 250 μM) (D). Os controles foram tratados com água destilada no caso do H₂O₂, e com etanol (concentração do etanol no meio de crescimento <1%) para os outros reagentes. O crescimento das leveduras foi monitorado a 600 nm por um período de 8 horas, começando no tempo zero (0). Os valores são apresentados como Δ do crescimento ± erro padrão da média (diferença entre o último e o primeiro ponto medido). Encontrou-se diferença significativa entre os diferentes tratamentos. ^(a,b,c)Diferença estatística significativa em comparação com o controle (p<0,05).

5.4 Crescimento em microplaca das linhagens de levedura em meio seletivo SCL-T⁻ na presença de distintos inibidores.

Em um conjunto de experimentos avaliamos o crescimento das células de levedura expostas a 4 concentrações de H₂O₂ (0,25, 0,5, 1 e 2 mM) e 3 de ATZ (2, 5 e 10 mM), um inibidor da enzima catalase. Na Figura 14 se observa que todas as linhagens de levedura apresentaram um crescimento menor nas duas concentrações maiores testadas de H₂O₂ (1 e 2 mM) na presença das 3 concentrações de ATZ. É importante destacar que nas concentrações menores de H₂O₂ e nos controles, se observa um aumento no crescimento das três linhagens

celulares quando tratadas com as 3 concentrações de ATZ (Figura 14, B, C, D), isto comparado ao controle sem ATZ. Os valores são apresentados como Δ do crescimento \pm erro padrão da média (diferença entre o último e o primeiro ponto medido) (Fig. 14A).

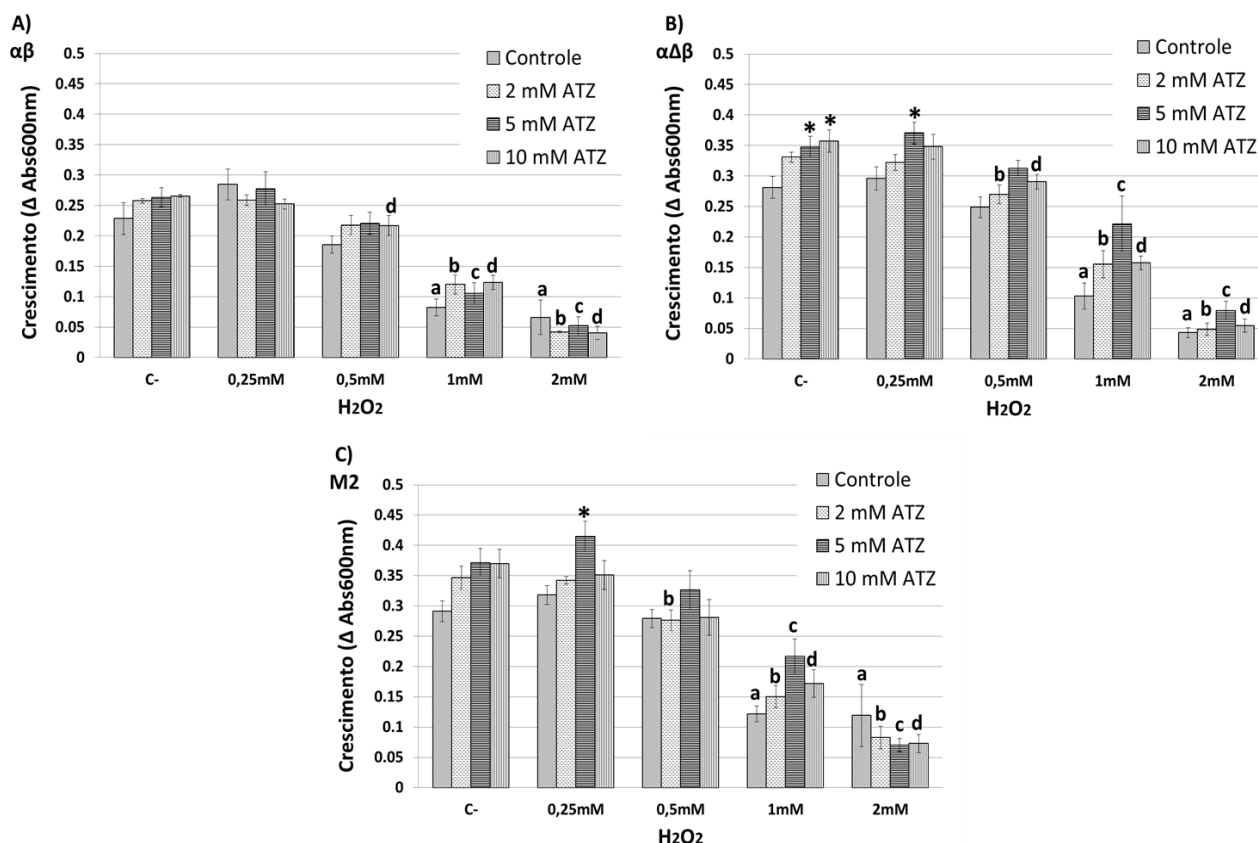


Figura 14. Crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M2 sob condições de estresse oxidativo + 3-Amino-1,2,4-triazole (ATZ). Uma colônia de cada uma das linhagens foi inoculada em meio seletivo, o pre-inóculo foi diluído para uma OD_{600 nm} final de 1 e foram feitas culturas em microplaca, com um volume final de 150 μ L. Todas as culturas foram tratadas com concentrações crescentes de H₂O₂ (0, 0,25, 0,5, 1 e 2 mM), e com 3-Amino-1,2,4-triazole (ATZ) em diferentes concentrações (2, 5 e 10 μ M). Água destilada foi adicionada aos controles nos volumes correspondentes ao H₂O₂ e ATZ usados no tratamento. O crescimento das leveduras foi monitorado a 600 nm por um período de 8 horas, começando no tempo zero (0). Os valores são apresentados como Δ do crescimento \pm erro padrão da média (diferença entre o último e o primeiro ponto medido). *Diferença significativa intra-grupos de tratamento comparados com o controle sem o inibidor. (a,b,c,d) Diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos em comparação aos controles sem H₂O₂ (p<0,05).

O crescimento das linhagens de levedura foi também avaliado sob estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ na presença do inibidor da síntese de glutathiona, o BSO. Foram usadas diferentes concentrações de H₂O₂ (0, 0,25, 0,5, 1 e 2 mM) e de BSO (2, 5 e 10 mM). Na Figura 15 pode-se observar que as três linhagens apresentaram um crescimento menor quando tratadas com as maiores concentrações de H₂O₂ (1 e 2 mM) na presença das diferentes

concentrações de BSO. O crescimento das linhagens tratadas com concentrações menores de H_2O_2 (0,25 e 0,5 mM) e com ATZ não diferiu do crescimento de seus respectivos controles. Estes resultados são similares aos resultados descritos para o tratamento das células com H_2O_2 e ATZ.

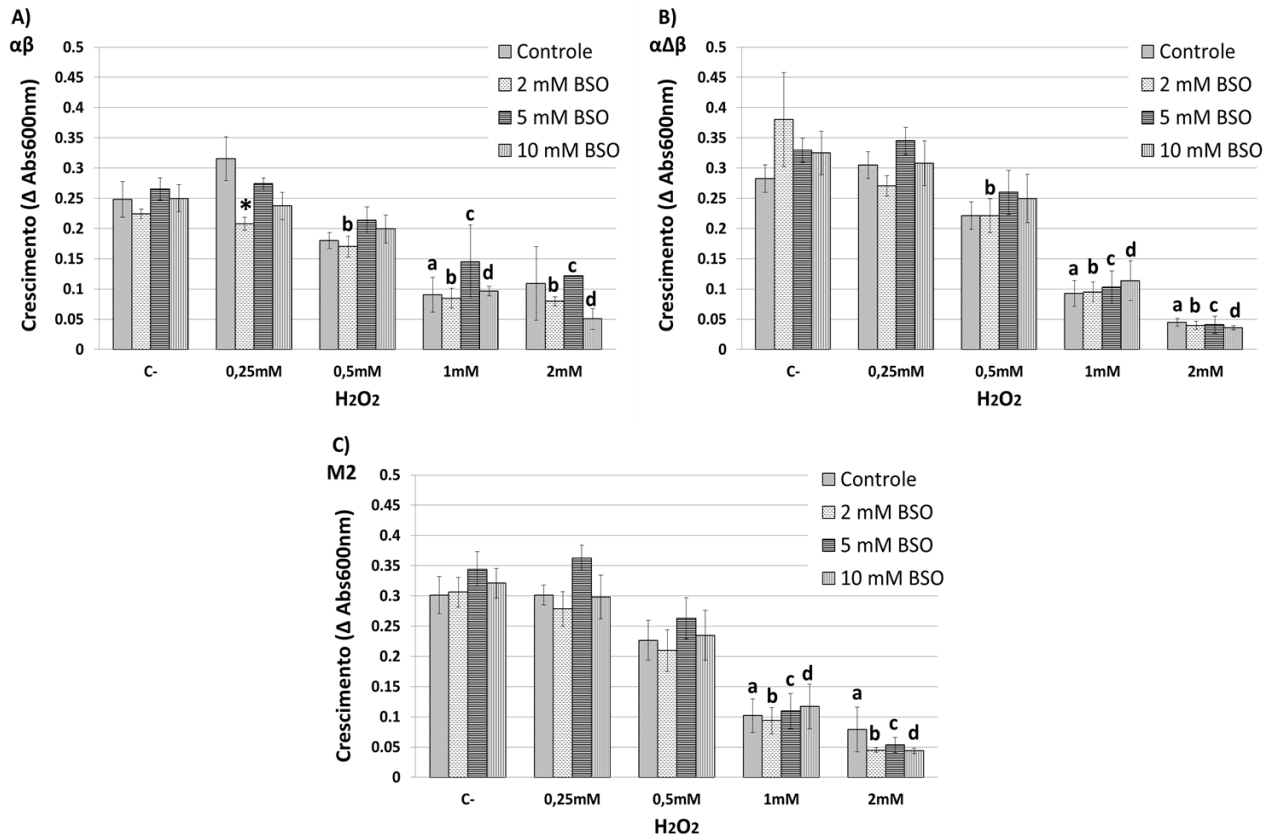


Figura 15. Crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* EG103αβ, EG103αΔβ e EG103M₂ sob condições de estresse oxidativo e DL-Buthionine-sulfoximine (BSO). Uma colônia de cada uma das linhagens foi inoculada em meio seletivo, o pre-inóculo foi diluído para uma OD_{600 nm} final de 1 e foram feitas culturas em microplaca, com um volume final de 150 μL. As culturas foram tratadas com concentrações crescentes de H_2O_2 (0; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM), e de DL-Buthionine-sulfoximine (BSO) em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mM). Os controles receberam água destilada em substituição ao H_2O_2 e BSO. O crescimento das leveduras foi monitorado a 600 nm por um período de 8 horas, começando no tempo zero (0). Os valores são apresentados como Δ do crescimento ± erro padrão da média (diferença entre o último e o primeiro ponto medido). *Diferença significativa intra-grupos de tratamento comparados com o controle sem o inibidor. (a,b,c,d) Diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos em comparação aos controles sem H_2O_2 (p<0,05).

Ao expor as células a diferentes concentrações de H_2O_2 (0, 0,25, 0,5, 1 e 2 mM) e a um agente quelante de ferro (DFO) (2, 5 e 10 mM) encontramos que todas as linhagens apresentavam um crescimento menor quando expostas às maiores concentrações de H_2O_2 (1 e 2 mM) testadas (Fig. 16), porém a linhagem EG103αβ teve um crescimento similar aos seus controles quando foi tratada com 1 mM de H_2O_2 na presença de DFO 2 e 5 mM (Figs 16B, D), o que sugere uma possível ação protetora do DFO.

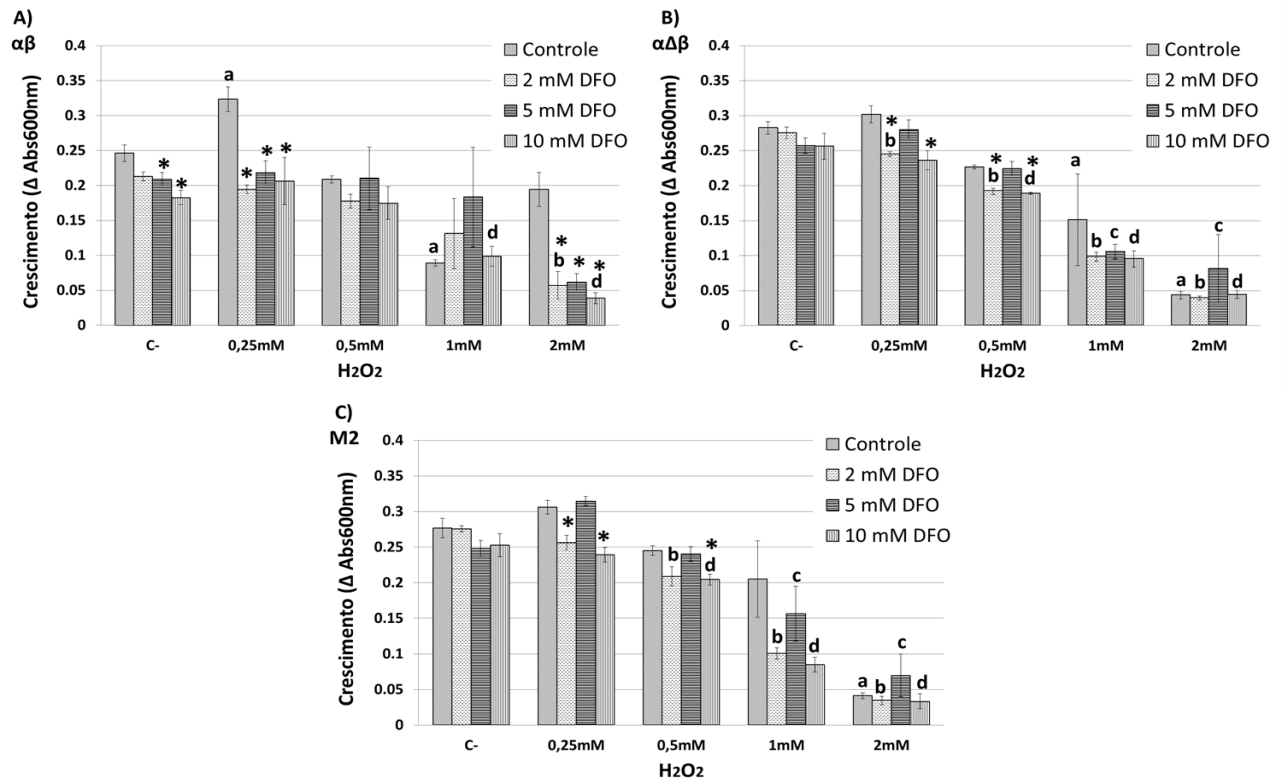


Figura 16. Crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M₂ sob condições de estresse oxidativo e na presença de Deferoxamina (DFO). Uma colônia de cada uma das linhagens foi inoculada em meio seletivo, o pre-inóculo foi diluído para uma OD_{600 nm} final de 1 e foram feitas culturas em microplaca, com um volume final de 150 μ L. As culturas foram tratadas com concentrações crescentes de H₂O₂ (0; 0,25; 0,5; 1 e 2mM), e DFO em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mM). Os controles receberam água destilada em substituição ao H₂O₂ e DFO. O crescimento das leveduras foi monitorado a 600 nm por um período de 8 horas, começando no tempo zero (0). Os valores são apresentados como Δ do crescimento \pm erro padrão da média (diferença entre o último e o primeiro ponto medido). *Diferença significativa intra-grupos de tratamento comparados com o controle sem o inibidor. (a,b,c,d)Diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos em comparação aos controles sem H₂O₂ (p<0,05).

Por fim, foi avaliado o crescimento das células expostas a várias concentrações de H₂O₂ (0, 0,25, 0,5, 1 e 2 mM) e ao inibidor de proteasoma (Z-LLF-CHO) em diferentes concentrações (20, 30 e 75 μ M). A Fig. 17 mostra que as linhagens de levedura apresentaram um crescimento menor quando comparado com os outros experimentos descritos acima. Em todas as linhagens, nas 3 maiores concentrações de H₂O₂ testadas as células sofreram uma queda significativa do crescimento quando na presença do inibidor de proteasoma. Hipotizamos que possa estar ocorrendo uma reação H₂O₂ e do DMSO (veículo do Z-LLF-CHO). Na concentração de 0,25 mM de H₂O₂ e 30 μ M de Z-LLF-CHO a linhagem EG103 $\alpha\beta$ apresenta um crescimento maior que seu controle, isto pode ser uma consequência do acúmulo de HIF-1 graças à ação do Z-LLF-CHO inibindo a degradação da proteína HIF-1 alfa

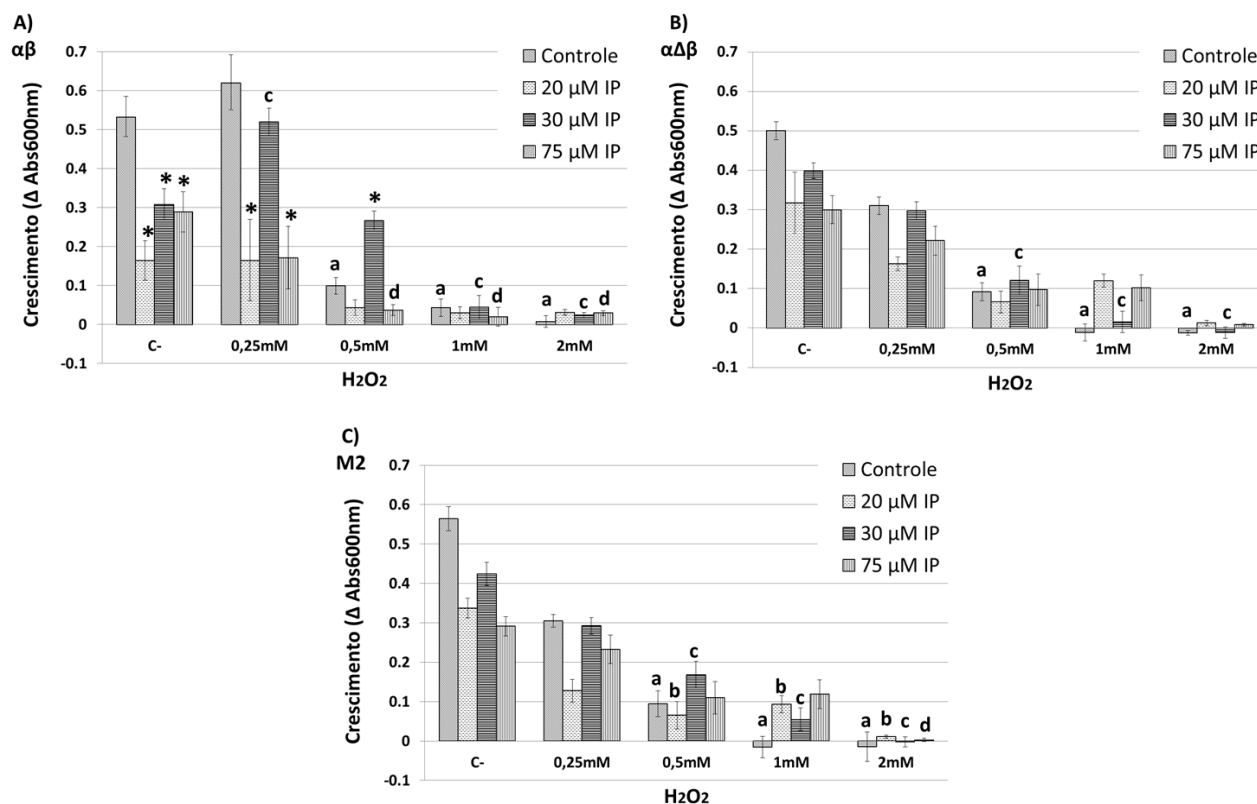


Figura 17. Crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* EG103 $\alpha\beta$, EG103 $\alpha\Delta\beta$ e EG103M2 sob condições de estresse oxidativo na presença do Inibidor de proteasoma (Z-LLF-CHO). Uma colônia de cada uma das linhagens foi inoculada em meio seletivo, o pre-inóculo foi diluído para uma OD_{600 nm} final de 1 e foram feitas culturas em microplaca, com um volume final de 150 μ L. As culturas foram tratadas com concentrações crescentes de H₂O₂ (0; 0,25; 0,5; 1 e 2mM), e com o inibidor de proteasoma (Z-LLF-CHO) em diferentes concentrações (20, 30 e 75 μ M). Os controles receberam água destilada em substituição ao H₂O₂ e inibidor (dissolvido em DMSO). O crescimento das leveduras foi monitorado a 600 nm por um período de 18 horas, começando no tempo zero (0). Os valores são apresentados como Δ do crescimento \pm erro padrão da média (diferença entre o último e o primeiro ponto medido). *Diferença significativa intra-grupos de tratamento comparados com o controle sem o inibidor. (a,b,c,d)Diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos em comparação aos controles sem H₂O₂ (p<0,05).

5.5 Medida da Glutaciona total (GSH-eq), reduzida (GSH) e dissulfeto (GSSG).

A concentração de glutaciona total (GSH-eq) (Fig. 18A) e de glutaciona dissulfeto (GSSG) (Fig. 18B) foi medida nos extratos das linhagens tratadas com H₂O₂ 1 mM. O nível de glutaciona total (GSH-eq) diminuiu na linhagem EG103M2 tratada com H₂O₂, porém não se alterou nas demais linhagens (diferenças estatisticamente significantes não foram encontradas). Entretanto, nota-se que os níveis de GSH-eq e GSSG tenderam a diminuir com a exposição ao H₂O₂.

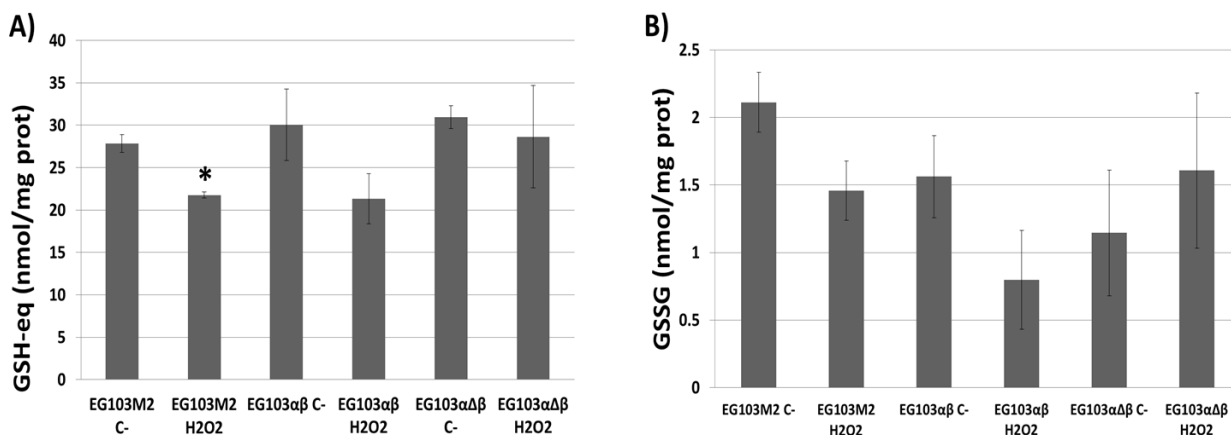


Figura 18. Concentrações de glutathiona total (GSH-eq) (A) e de glutathiona dissulfeto (GSSG) (B) em extratos das linhagens de leveduras EG103αβ, EG103αΔβ e EG103M2 tratadas com H₂O₂. Os valores estão expressos em nmol/mg prot. *Diferença estatística significativa entre o controle e o tratamento de cada linhagem. N=3.

A medida de glutathiona reduzida (GSH) (Fig. 19 A) foi definida como a diferença entre as concentrações de GSH-eq menos GSSG. Novamente, apenas para a linhagem EG103M2 houve uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de GSH, um importante indicador de desequilíbrio redox, com a exposição ao H₂O₂. Porém, pode-se observar uma tendência de diminuição dos níveis de GSH e GSSG/GSH-eq na linhagem EG103αβ tratada com H₂O₂ 1 mM (Fig. 19B).

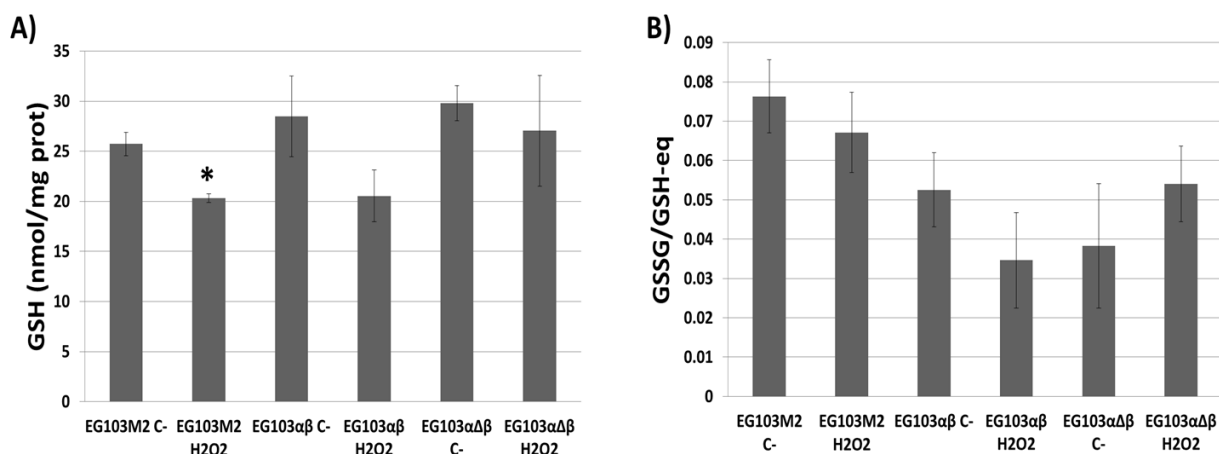


Figura 19. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) (A) e razão entre os conteúdos de glutathiona dissulfeto e glutathiona total (GSSG/GSH-eq) (B). A glutathiona foi medida nos extratos proteicos obtidos das 3 linhagens de leveduras EG103αβ, EG103αΔβ e EG103M2, tratadas (1 mM H₂O₂) e controles. Os valores estão expressos em nmol/mg prot. *Diferença estatística significativa entre o controle e o tratamento de cada linhagem. N=3.

Foi feito a análise dos dados para se encontrar a porcentagem de glutathiona reduzida (GSH) (Fig. 20A) e glutathiona oxidada (GSSG) (Fig. 20, B) em relação à glutathiona total (GSH-eq). A Fig. 20 mostra que a quantidade de GSH sempre foi maior aos 90 % e a quantidade de GSSG está por embaixo dos 10%, o que está de acordo com a literatura estudada (Meister, 1988).

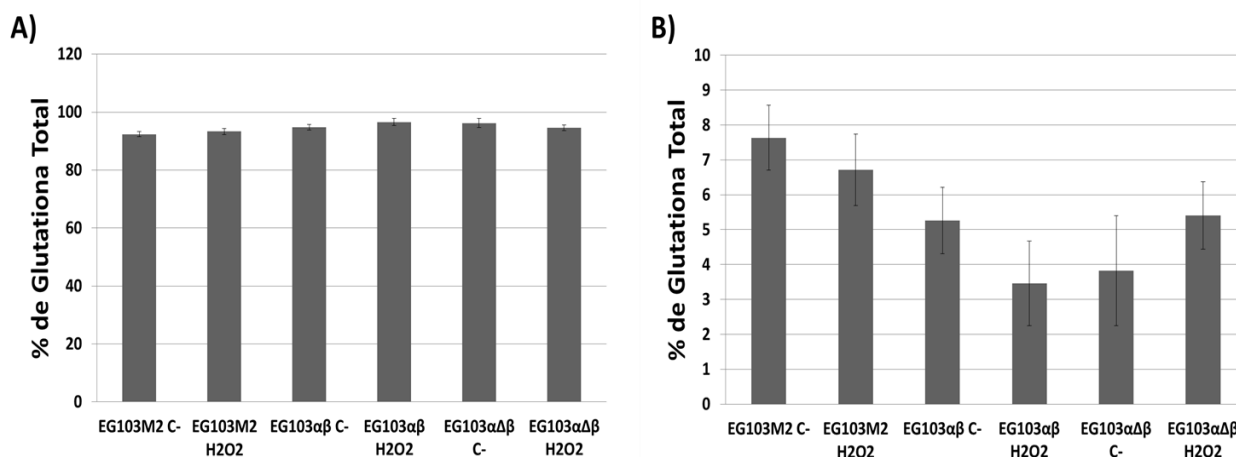


Figura 20. Porcentagens de glutathiona reduzida (GSH) (A) e glutathiona dissulfeto (GSSG) (B) em relação a glutathiona total (GSH-eq). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os controles e os tratamentos de cada linhagem. N=3.

5.6 Medição da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em microplaca.

Para medir a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), foi feita uma reação onde se induz a geração de radical superóxido em um sistema não enzimático: a fenazina metossulfato (PMS) é reduzida pelo NADH e reage com o oxigênio, formando o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), este por sua vez é capaz de doar um elétron ao azul de nitrotetrazólio (NBT), reduzindo-o a formazano, que apresenta um máximo de absorção a 560 nm. O potencial antioxidante de compostos ou extratos é avaliado através da capacidade para competir com o NBT pelo radical superóxido gerado (Ewing and Janero, 1995).

A **Tabela 5** apresenta os dados dos equivalentes de unidades (U) de SOD medidos durante o experimento, uma U equivale à quantidade de SOD necessária para reduzir a taxa total de formação de formazano em 10 %. Os dados são médias de dois experimentos.

Tabela 5. Equivalentes de unidades (U) de SOD nas linhagens de leveduras tratadas ou não com H₂O₂. Os dados estão expressos em U*. Os dados mostrados são médias de dois experimentos.

	U SOD total	U Cu, Zn-SOD	U Mn-SOD
EG103M2 Controle	5.857	3.558	2.299
EG103M2 H₂O₂	5.782	4.509	1.273
EG103$\alpha\beta$ Controle	4.761	2.437	2.324
EG103$\alpha\beta$ H₂O₂	5.769	3.765	2.004
EG103$\alpha\Delta\beta$ Controle	6.172	3.361	2.810
EG103$\alpha\Delta\beta$ H₂O₂	5.745	4.190	1.555

*(Uma unidade reduz em 10 % a taxa total de formação de formazano).

6. DISCUSSÃO

6.1 Crescimento das linhagens de levedura em normóxia.

Neste estudo objetivamos investigar os efeitos da expressão das duas subunidades que compõem o fator de transcrição HIF-1 em *S. cerevisiae* quanto à susceptibilidade ao estresse oxidativo promovido pela exposição a agentes oxidantes. Inicialmente analisamos o crescimento das leveduras duplo transformadas (EG103 $\alpha\beta$) em condições de normóxia em comparação com duas outras cepas controle (EG103M2 e EG103 $\alpha\Delta\beta$) (Figura 8) na ausência de agentes oxidantes. A linhagem recombinante EG103 $\alpha\beta$ apresentou uma menor taxa de crescimento quando comparada à linhagem EG103M2. Uma das possíveis explicações para este menor crescimento pode ser a ação do HIF-1 sobre HREs presentes no genoma da levedura, pois já foi demonstrado que o fator de transcrição HIF-1 está envolvido na resposta celular a diversos estímulos e também regula vários processos celulares tais como o crescimento celular, sobrevivência e apoptose (Höpfl et al., 2004; Koh et al., 2008; Semenza, 2000), portanto a ligação do HIF-1 aos HREs pode modular a progressão do ciclo celular e replicação do DNA (Ferreira et al., 2007; Kaluz et al., 2008).

Uma outra explicação para o menor crescimento da linhagem EG103 $\alpha\beta$ poderia ser a maior demanda energética devido à expressão da proteína recombinante nessa linhagem. A expressão de genes recombinantes pode afetar negativamente o crescimento de células transformadas (Gonzalez et al., 2003), e diversas explicações têm sido propostas para isso; a) o uso dos recursos celulares na replicação e manutenção do sistema de expressão, transcrição do gene recombinante, e a síntese da proteína recombinante; b) a diluição das proteínas nativas pela proteína recombinante; c) o efeito da síntese de DNA exógeno durante a replicação do plasmídeo; e d) a toxicidade da proteína recombinante (Gonzalez et al., 2003; Görgens et al., 2001). Entretanto, uma vez que a linhagem EG103 $\alpha\Delta\beta$ cresceu de modo semelhante à linhagem EG103M2, podemos descartar tais efeitos.

Diversos estudos demonstram que o padrão de expressão gênica em diferentes estágios de crescimento celular, e a taxa de produção de proteínas específicas, têm uma correlação positiva com a produção de proteínas extracelulares, e uma correlação negativa com a energia

metabólica disponível e as vias de secreção em diferentes tipos de células (Sevastyanovich et al., 2009). Uma linhagem de levedura recombinante expressando grandes quantidades de SOD apresentou um crescimento 23,3% menor quando comparada com a linhagem selvagem (Díaz et al., 2009). Em outro estudo a análise do crescimento de cinco linhagens de leveduras recombinantes mostrou que pelo menos três delas apresentavam diferença significativa no crescimento quando comparadas com seus controles (Görgens et al., 2001).

Outro aspecto que pode ser considerado são prováveis modificações pós-traducionais sofridas pelo HIF-1, tais como, hidroxilação, acetilação, nitrosilação e fosforilação que possam afetar sua função de ativação de genes alvos envolvidos com o crescimento celular (Çelik and Çalık, 2012).

Dado os resultados podemos inferir que a diferença no crescimento não se deve ao fato de que as células de levedura estão desviando sua maquinaria de expressão proteica para a expressão da proteína recombinante (HIF-1).

6.2 Curva de crescimento das linhagens de levedura em meio seletivo SCL-T- na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

O HIF-1 está envolvido na resposta celular à variações nas concentrações de oxigênio, ativando a transcrição de diversos genes. Além disso, está envolvido em certos processos fisiológicos e patológicos, assim como na progressão do câncer (Braliou et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Semenza, 2007; Semenza, 2012).

O estresse oxidativo tem sido implicado em uma grande variedade de processos biológicos e doenças, incluindo o cancro, promoção de tumores, artrite, doença cardíaca, o envelhecimento, a morte celular programada, e toxicidade de fármacos (Jamieson, 1992; Ng et al., 2008). As células apresentam uma gama de respostas ao estresse oxidativo, incluindo a adaptação para aumentar sua resistência, atraso na progressão do ciclo celular e mudanças generalizadas na expressão gênica. No entanto em concentrações muito elevadas de agentes oxidantes, elas não são capazes de sobreviver e sofrem apoptose (Branco et al., 2004; Gałgańska et al., 2010). A resposta adaptativa de células de *S. cerevisiae* ao H₂O₂ envolve a síntese *de novo* de proteínas. Análises proteômicas mostraram que muitas proteínas são induzidas ou reprimidas em resposta ao H₂O₂, embora estes estudos tenham sido feitos

principalmente em doses mais elevadas do que as que conduzem à adaptação máxima (Ng et al., 2008).

Tem sido demonstrado que durante a fase estacionária, as células de *S. cerevisiae* possuem uma maior resistência ao H₂O₂. Por outro lado na fase Log a permeabilidade da membrana é maior, e quando as células são expostas a H₂O₂ externo se gera um gradiente entre a concentração intracelular e extracelular de H₂O₂ (Sousa-Lopes et al., 2004). Isto é importante já que se o gradiente não se gerar, as enzimas intracelulares não conseguem proteger as células da exposição ao H₂O₂ (Branco et al., 2004).

Investigação sobre as alterações na expressão de genes de leveduras, subjacentes à resposta adaptativa ao estresse causado por H₂O₂ e analisadas por electroforese em gel bidimensional comparativo das proteínas celulares totais mostrou que a síntese de pelo menos 115 proteínas é estimulada por H₂O₂, enquanto que outras 52 proteínas são reprimidas por este tratamento (Godon et al., 1998). Alguns estudos mostram que o tratamento de leveduras com o hidroperóxido do ácido linoleico (LAH) produz uma parada na progressão do ciclo celular na fase G₁, antes do “checkpoint” inicial. Isto possibilita à célula preparar suas defesas antioxidantes e sistemas para induzir o reparo adequado do dano oxidativo antes do retorno ao ciclo celular. Esta parada é similar em células tratadas com H₂O₂ e menadiona (Fong et al., 2008). Tem sido mostrado que células pré-tratadas com uma dose baixa, sub-letal, de um oxidante tal como H₂O₂, rapidamente montam uma resposta protetora transitória para uma dose subsequente maior que de outra forma seria letal (Ng et al., 2008).

Primeiramente analisamos o crescimento das diferentes linhagens usado tubos de ensaio. De acordo com a literatura revisada podemos sugerir que a redução do crescimento das linhagens de levedura nas duas concentrações maiores de H₂O₂ (500 µM e 1 mM) resulta do estresse oxidativo causado nas células, o que finalmente leva à morte apoptótica. Quanto à redução no crescimento quando as células são tratadas com as concentrações menores (100 e 250 µM) hipotizamos que uma resposta adaptativa possa ocorrer, já que esta resposta inclui uma parada no crescimento celular.

No caso da linhagem EG103αβ, embora tenha ocorrido uma redução no crescimento na ausência de H₂O₂, pode-se observar que ela resistiu melhor ao tratamento com H₂O₂ (a diferença estatisticamente significativa só ocorreu com 1 mM H₂O₂). Isso pode ser devido à ação do HIF-1 sobre os genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, o que conferiria às

células uma resistência maior ao insulto produzido pelo H_2O_2 (Branco et al., 2004; Sousa-Lopes et al., 2004).

6.3. Crescimento em microplaca das linhagens de levedura em meio seletivo SCL-T na presença de agentes oxidantes.

Os resultados obtidos quando analisamos o crescimento das diferentes linhagens expostas ao H_2O_2 em microplacas foram similares com o primeiro experimento (Item 6.2), quando usamos tubos de ensaios, exceto pelo fato de que houve um aumento no crescimento das linhagens EG103 $\alpha\beta$ e EG103M2 quando tratadas com a concentração de 0,25 mM H_2O_2 , a qual corresponde a uma dose sub-letal. Isto indica que talvez uma resposta adaptativa esteja ocorrendo, como demonstrado anteriormente por outros autores (Ng et al., 2008).

A menadiona (MD) é um composto altamente reativo com tióis e outros nucleófilos, devido a isso, reage rapidamente com a GSH (um tripeptídeo com função antioxidante) e foi demonstrado que seus efeitos tóxicos acontecem depois da depleção da GSH (Castro et al., 2007). Algumas pesquisas mostram que quando a levedura *S. cerevisiae* cresce em condições aeróbicas é sensível a concentrações milimolares de MD e que essas células podem adquirir resistência a MD pela pre-incubação com baixas concentrações deste composto. Esta adaptação é diferente daquela com H_2O_2 . Também foi observado que o pré-tratamento com H_2O_2 pode sensibilizar as células à MD como resultado da depleção da GSH intracelular (Flattery-O'Brien et al., 1993; Ządzinski et al., 1998).

Estudos demonstraram que a MD é tóxica para *S. cerevisiae* e inibe seu crescimento em meio líquido. A exposição a concentrações maiores que 1 mM resulta numa inibição total do crescimento da linhagem de levedura Sp4 (tipo selvagem), além disso, concentrações de 0,5 e 0,25 mM inibem o crescimento parcialmente (Ządzinski et al., 1998). Uma vez que um dos principais produtos da decomposição de MD no interior das células é o H_2O_2 , Flattery-O'Brien *et al.* (1993) demonstraram que o pré-tratamento com H_2O_2 pode tornar as células resistentes a MD. Porém, o pré-tratamento com MD não torna as células resistentes ao H_2O_2 , isto pode ser explicado pela natureza da resposta de proteção induzida por cada oxidante em vez das espécies reativas responsáveis pelo dano celular. Uma vez que o pré-tratamento com H_2O_2 protege contra MD, então H_2O_2 pode atuar para induzir a desintoxicação de espécies que são produzidas por ambos os oxidantes, em contraste, MD induz um sistema diferente, que pode atuar numa fase inicial da geração de radicais livres ou que pode excluir, eliminar ou

inativar MD, ou reduzir a sua capacidade de gerar radicais livres sem afetar a toxicidade de H₂O₂ (Flattery-O'Brien et al., 1993).

Com base na literatura, podemos hipotizar que a diminuição no crescimento das leveduras quando tratadas com a maior concentração de MD (250 µM) pode se dar pela depleção da GSH e pela formação de EROs, o que causaria estresse oxidativo, não permitindo que as células consigam preparar suas defesas antioxidantes. Já com as concentrações menores (concentrações sub-letais), talvez ocorra uma diminuição na concentração de GSH mas as células conseguem montar suas defesas e aumentar a taxa de sobrevivência.

Parte da resposta fisiológica das leveduras ao estresse oxidativo consiste em transformar o oxidante em um produto menos prejudicial. No caso do hidroperóxido de cumene (CHP), o produto da redução de dois elétrons é álcool cumil (COH), observou-se que a exposição de culturas de leveduras em crescimento exponencial a CHP resultou numa rápida conversão deste composto para COH, com a maior parte do CHP desaparecendo dentro de 20 min. Este resultado fornece uma escala de tempo para a resposta fisiológica que ocorre “downstream” dos eventos sinalizadores e resulta numa resposta transcricional (Sha et al., 2013). Assim, no presente estudo, os crescimentos similares entre os controles e os tratamentos com CHP das diferentes linhagens indicam que talvez o CHP foi reduzido rapidamente para seu álcool, não induzindo assim estresse oxidativo nas células.

Uma comparação entre os dados reportados para o H₂O₂ identificou 664 genes que respondem especificamente à CHP, sugerindo respostas transcricionais distintas para estes dois peróxidos. Entre os genes induzidos somente por CHP, estão genes principalmente relacionados com a membrana e a parede celular, e a proteólise, enquanto aqueles reprimidos estão envolvidos na função mitocondrial (Sha et al., 2013). As células de *S. cerevisiae* apresentam sensibilidade a concentrações de H₂O₂ de 0,5 e 1 mM, e 100 e 150 µM tanto para MD quanto para CHP. Além disso, foi demonstrado em linhagens mutantes sem o gene *gsh 1* funcional, que essas apresentavam hiper-sensibilidade ao H₂O₂ e ao t-BHP mas mostraram uma resistência similar ao tipo selvagem quando tratadas com CHP, o que indica a presença nas leveduras de vias de detoxificação diferentes para esse oxidante (Grant et al., 1996).

Os resultados encontrados neste trabalho quando as células foram expostas a MD, CHP e t-BHP são confirmados pelos estudos que mostram que concentrações abaixo de 250 µM são apenas sub-letais e que geram um estado de resistência nas células. É importante destacar que a linhagem EG103αβ teve um crescimento igual ao controle na concentração de

50 μM de MD, entanto que as outras duas linhagens apresentaram um crescimento menor. Podemos hipotizar que o HIF-1 está modulando a resposta ao estresse produzido por MD e ativando genes envolvidos na detoxificação de MD.

A variabilidade observada no crescimento quando as diferentes linhagens estudadas neste trabalho são expostas a diferentes oxidantes indica a indução de distintas respostas adaptativas nas células. A diminuição no crescimento nas concentrações maiores pode se dar como resultado de grande dano oxidativo pela geração de EROs, ou também por causa da resposta adaptativa das células, esta parada no crescimento é aproveitada para iniciar a transcrição e produção de distintas enzimas e proteínas antioxidantes tais como catalase, GSH, SOD, o que resulta numa resistência aos agentes oxidantes.

6.4 Crescimento em microplaca das linhagens de levedura em meio seletivo SCL-T⁻ na presença de distintos inibidores.

O aminotriazol é um conhecido inibidor da catalase que é amplamente utilizado para analisar o papel da catalase *in vivo* e *in vitro*. ATZ inativa irreversivelmente a catalase humana pela interação covalente com His75 no centro ativo da enzima para impedir a ligação do H_2O_2 . A inibição da catalase pelo ATZ causa estresse oxidativo e induz mecanismos compensatórios de proteção. Por exemplo, foi mostrado que a inibição da catalase resulta em estresse oxidativo em tecidos de truta arco-íris (Vasylykiv et al., 2011). Um estudo com células de mamíferos, mostrou que a lenta inibição da catalase pelo ATZ pode ser devido à reação do ATZ inalterado com a enzima, e não está ligada com a oxidação da enzima por compostos transitórios (composto I-ATA) como tem sido proposto (Metodiewa and Brian Dunford, 1991).

Em peixes, foi observada uma diminuição de 83% na atividade da catalase no fígado depois de 24 horas de um tratamento intraperitoneal com ATZ (0.5 mg/g peso úmido) e foi mantida até 168 horas depois. No rim, a atividade da catalase foi reduzida em 70%. A atividade de glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferase no rim teve um aumento depois do tratamento com ATZ, pelo contrário no fígado suas atividades diminuíram. A atividade de glutathiona S-transferase apresenta uma correlação inversa com a catalase ($R^2 = 0,65-0,81$), o

que sugere que a resposta ao esgotamento da catalase envolve mudanças compensatórias nas atividades de enzimas do metabolismo da glutathione (Bagnyukova et al., 2005).

De acordo com os resultados obtidos e a literatura consultada, propomos que o aumento no crescimento das linhagens quando tratadas com as concentrações menores de H_2O_2 e as distintas concentrações de ATZ se deve a mecanismos de proteção compensatórios que conferem às células uma resistência, já que ao inibir-se a catalase ocorre um aumento na atividade da glutathione S-transferase. Nas concentrações mais altas de H_2O_2 , as células não conseguem ter esta proteção e por isso seu crescimento se vê reduzido.

Durante a redução das EROs pela glutathione, a GSH é convertida em GSSG pela reação acoplada à glutathione peroxidase. A GSSG formada é reciclada rapidamente para GSH pela ação da glutathione redutase (GR). Em células epiteliais incubadas por 24 horas com BSO, se observou um acúmulo de GSSG, de forma dose dependente. Este efeito foi associado com um decréscimo dose dependente dos níveis intracelulares de GSH (Haddad, 2002). Marengo *et al.* (2008) demonstraram que depois de tratar diferentes linhagens celulares de neuroblastoma (NB) com uma concentração 1 mM de BSO por 24 horas, os níveis de GSH decresciam dramaticamente, até serem praticamente indetectáveis. Também encontraram que em algumas linhagens, os níveis de EROs aumentavam de 3 a 4 vezes depois de 24 horas de incubação com BSO, e de 5 a 6 vezes depois de 72 horas de tratamento. Foi observado também que o tratamento com BSO causou uma expressão maior de SOD enquanto as concentrações de catalase permaneceram inalteradas (Marengo et al., 2008). Os resultados de crescimento de células tratadas com BSO e expostas a um insulto oxidativo indicam que mesmo com a inibição da síntese de glutathione as células conseguiram sobreviver ao insulto oxidativo. Isto poderia ocorrer devido a mudanças nos níveis de expressão de SOD e/ou manutenção dos níveis de catalase, o que permitiria às células decompor o H_2O_2 rapidamente.

Em um estudo realizado em camundongos, foi encontrado que o tratamento dos animais com DFO produzia uma estabilização e induzia o acúmulo de HIF-1 α pela inibição das prolin hidroxilases (PHD) (Hou et al., 2013; Wu et al., 2010), as quais são enzimas encarregadas de promover a hidroxilação da subunidade alfa do HIF-1 levando à sua degradação proteosomal. Foi mostrado que o DFO induz fortemente a atividade do HIF-1 de uma forma dose dependente (Hou et al., 2013).

As enzimas PHD são dioxigenases altamente conservadas dependentes de Fe^{2+} e ascorbato que catalisam a trans-4-hidroxilação de resíduos de prolina específicos (posições

402 e 564 na subunidade alfa do HIF-1 humano) no HIF-1 α . PHDs são os sensores primários de oxigênio que mantêm baixos os níveis de proteína HIF-1 α durante a normóxia e também permitem a proteína ser estabilizada rapidamente durante a hipóxia (Speer et al., 2013). Vários mecanismos de ação têm sido propostos para o tratamento com DFO, primeiro, dado que o DFO é um quelante de ferro, este se liga a ferro férrico, dessa forma previne a formação de potentes radicais hidroxila através da reação de Fenton/Haber-Weiss. Em segundo lugar, as concentrações de DFO de 0,5 a 1 mmol/L podem eliminar os radicais superóxido e radicais hidroxila e prevenir a morte mediada por neutrófilos de células endoteliais em cultura (Li et al., 2011). Como a literatura mostra que concentrações entre 0,5 e 1 mM de DFO exercem uma ação protetora, uma vez que sua presença na cultura inibe as PHDs e promove o acúmulo do HIF-1 alfa, podemos hipotizar que o maior crescimento da linhagem EG103 $\alpha\beta$ quando foi tratada com 1 mM de H₂O₂ na presença de 2 e 5 mM de DFO foi causada pelo acúmulo de HIF-1 e à resposta adaptativa que este gera na célula. Porém, na concentração 10 mM de DFO o crescimento foi igual ao controle, isso poderia ser explicado devido a alguma ação tóxica da alta concentração de DFO nas células.

Foi relatado que o DMSO induz estresse oxidativo de forma dose dependente em células de levedura da linhagem EG103WT, e em suas linhagens mutantes carentes de SOD 1, SOD 2, ou ambas. O efeito é maior nas linhagens mutantes que não expressam nenhuma SOD (Sadowska-Bartosz et al., 2013). Assim uma possível explicação para a diminuição no crescimento das leveduras quando tratadas com o inibidor de proteasoma e o DMSO, o qual foi seu diluente, poderia ser a ação sinérgica entre o DMSO e o H₂O₂, o que induziria um estresse oxidativo muito forte onde as células não conseguiriam ter uma adaptação.

6.5 Medida da Glutathiona total (GSH-eq), reduzida (GSH) e dissulfeto (GSSG).

A glutathiona reduzida (GSH) é utilizada pelas glutathiona peroxidases (GPXs) que reduzem o H₂O₂ e peróxidos orgânicos e formam GSSG. GPXs protegem as proteínas e membranas celulares contra a oxidação (Meister, 1988). Foi reportado que o conteúdo de glutathiona intracelular em células na fase estacionária é aproximadamente 3 vezes maior do que em células em fase log, o que mostra que o nível de glutathiona intracelular também pode ser um dos fatores que determinam a resistência contra diferentes estresses e leveduras (Izawa et al., 1995).

O retorno ao equilíbrio redox após o estresse oxidativo depende da coordenação adaptativa de respostas entre as vias de sinalização associadas ao estado redox, fatores genéticos regulatórios e os antioxidantes. A participação da glutathione na fisiologia do metabolismo celular reflete a importância desta molécula em a) a desintoxicação de peróxidos altamente reativos por conjugação de electrófilos e metais através da reação da glutathione acoplada a peroxidase, (b) a manutenção da integridade das proteínas intracelulares, reduzindo ligações dissulfeto e regulando a sua síntese; (c) a regulação do equilíbrio redox celular (Haddad et al., 2000). Os resultados obtidos mostraram uma diminuição de GSH-eq somente nas células EG103M2 tratadas com H₂O₂. Uma possível explicação para este resultado poderia ser a diminuição da GSH como resultado da reação com o oxidante.

6.6. Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em microplaca.

A enzima superóxido dismutase catalisa a conversão de O₂^{•-} a H₂O₂ e oxigênio molecular. Além disso atua com outras enzimas antioxidantes (por exemplo catalase e glutathione peroxidase) para prevenir o dano aos tecidos por O₂^{•-} e oxidantes derivados do radical superóxido tais como o radical hidroxil e o peroxinitrito (Ewing and Janero, 1995).

A levedura *S. cerevisiae*, como a maioria dos outros eucariotos, possui duas superóxido dismutase (SOD) que catalisam a dismutação de superóxido a peróxido de hidrogênio. Uma enzima contendo manganês (Mn-SOD), codificada pelo gene SOD2, exerce de 5-15% do total da atividade da superóxido dismutase e é o principal captador de superóxido nas mitocôndrias, e uma superóxido dismutase contendo cobre e zinco (Cu, Zn-SOD) codificada pelo gene SOD1, a qual exerce até 90% da atividade total de SOD (Lushchak et al., 2005).

Os resultados mostrados na Tabela 5 indicam que as atividades de Cu, Zn-SOD presentes nos extratos das leveduras tratadas ou não com H₂O₂ são maiores que as de Mn-SOD. Isto pode ser explicado pelo fato de que a Cu, Zn-SOD é uma enzima citosólica e se encontra em maiores quantidades nas células, por outro lado a Mn-SOD se encontra principalmente na mitocôndria e sua concentração é mais baixa com relação à Cu, Zn-SOD (Lushchak et al., 2005; Zelko et al., 2002). Os dados também mostram uma diferença entre a

quantidade de Cu, Zn-SOD e Mn-SOD nos extratos das células tratadas com 1 mM de H₂O₂, o que indica que há um aumento na produção da enzima Cu, Zn-SOD para permitir a sobrevivência das células na presença de H₂O₂.

7. CONCLUSÕES

Depois de analisar o crescimento da linhagem de levedura EG103 $\alpha\beta$ nos diferentes experimentos, comparada com as outras duas linhagens (EG103 $\alpha\Delta\beta$, EG103M2) conseguimos observar que o crescimento dessa linhagem é geralmente mais baixo, o que pode acontecer devido ao gasto energético das células para produzir a proteína heteróloga (HIF-1) e realizar todas as modificações post-traducionais (glicosilação, fosforilação e acetilação) necessários para a funcionalidade da mesma.

Na linhagem EG103 $\alpha\beta$, a qual expressa as duas subunidades do HIF-1, se encontrou que o seu crescimento não sofreu uma diminuição grande em comparação com as outras linhagens de leveduras tratadas com H₂O₂. A expressão do HIF-1 protegeu as leveduras até uma concentração de 0,5 mM de H₂O₂, já nas concentrações acima desse valor o crescimento da linhagem diminuiu.

Quando as células foram tratadas com diferentes agentes oxidantes MD, CHP e t-BHP, os padrões de crescimento eram variáveis de acordo com o oxidante, isto pode acontecer pelo mecanismo de reação de cada um, o que gera uma resposta diferente para cada composto. Além disso a parada no crescimento é uma estratégia que permite a célula se preparar para afrontar o insulto oxidativo.

No tratamento com os inibidores o ATZ induziu uma resposta de proteção nas células, o que poderia ser explicado pela inibição da catalase e indução de um aumento na atividade das enzimas como a glutathiona peroxidase. Já quanto às células tratadas com BSO, o qual inibe a síntese da glutathiona, é possível que a catalase seja capaz de decompor todo o H₂O₂. O tratamento com DFO protegeu a linhagem EG103 $\alpha\beta$, talvez por causar acúmulo de HIF-1 alfa. Finalmente, ao tratar as células com o inibidor de proteasoma não se encontrou a resposta esperada, possivelmente pela ação sinérgica do DMSO e o H₂O₂, os quais produzem um estresse oxidativo forte e possivelmente a parada no crescimento celular.

Os resultados de medidas de GSH-eq, GSH e GSSG, mostraram que a linhagem EG103 M2 expostas ao H₂O₂ apresenta uma quantidade menor de GSH-eq, mas os demais níveis permaneceram inalterados nas outras linhagens. Os resultados referentes às medidas de SOD

mostram uma possível indução de Cu/Zn SOD nas diferentes linhagens tratadas com H_2O_2 , porém os experimentos necessitam serem repetidos para confirmação dessa resposta.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alberghina, L., Mavelli, G., Drovandi, G., Palumbo, P., Pessina, S., Tripodi, F., Coccetti, P., and Vanoni, M. (2012). Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: Basic regulatory design and protein–protein interaction network. *Biotechnology Advances* **30**, 52-72.
- Allen, R. G., and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 463-499.
- Ayala, A., Parrado, J., Bougria, M., and Machado, A. (1996). Effect of Oxidative Stress, Produced by Cumene Hydroperoxide, on the Various Steps of Protein Synthesis: MODIFICATIONS OF ELONGATION FACTOR-2. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 23105-23110.
- Bagnyukova, T. V., Storey, K. B., and Lushchak, V. I. (2005). Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **142**, 335-341.
- Bárdos, J. I., and Ashcroft, M. (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **1755**, 107-120.
- Barreiros, A., David, J. M., and David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova* **29**, 113.
- Bell, E., and Chandel, N. (2007). Mitochondrial oxygen sensing: regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species. *Essays Biochem* **43**, 17-28.
- Bennett, M. R. (2001). Reactive Oxygen Species and Death : Oxidative DNA Damage in Atherosclerosis. *Circ Res* **88**, 648-650.
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., and Di Lisa, F. (1999). Mitochondria and cell death. *European Journal of Biochemistry* **264**, 687-701.
- Boucherie, H. (1985). Protein synthesis during transition and stationary phases under glucose limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **161**, 385-92.
- Braliou, G. G., Venieris, E., Kalousi, A., and Simos, G. (2006). Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: A simple in vivo system to identify and characterize HIF-1 α effectors. *Biochemical and biophysical research communications* **346**, 1289-1296.
- Branco, M. R., Marinho, H. S., Cyrne, L., and Antunes, F. (2004). Decrease of H₂O₂ Plasma Membrane Permeability during Adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 6501-6506.

- Brejning, J., and Jespersen, L. (2002). Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* **75**, 27-38.
- Brigelius-Flohé, R., and Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1830**, 3289-3303.
- Cardoso, A. R., Chausse, B., da Cunha, F. M., Luévano-Martínez, L. A., Marazzi, T. B. M., Pessoa, P. S., Queliconi, B. B., and Kowaltowski, A. J. (2012). Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free Radical Biology and Medicine* **52**, 2201-2208.
- Casado, Á., Encarnación López-Fernández, M., and Ruíz, R. (2005). Marcadores de estrés oxidativo en el síndrome de Down. *Revista Médica Internacional sobre el Síndrome de Down* **9**, 18-25.
- Castro, F. A. V., Herdeiro, R. S., Panek, A. D., Eleutherio, E. C. A., and Pereira, M. D. (2007). Menadione stress in *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in the glutathione transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1770**, 213-220.
- Catalá, M., Gasulla, F., Pradas del Real, A. E., García-Breijo, F., Reig-Armiñana, J., and Barreno, E. (2013). The organic air pollutant cumene hydroperoxide interferes with NO antioxidant role in rehydrating lichen. *Environmental Pollution* **179**, 277-284.
- Çelik, E., and Çalık, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* **30**, 1108-1118.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs."
- Chiou, T.-J., and Tzeng, W.-F. (2000). The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology* **154**, 75-84.
- Circu, M. L., and Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 749-762.
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., and Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology* **320**, 1-11.
- Díaz, H., Andrews, B. A., Hayes, A., Castrillo, J., Oliver, S. G., and Asenjo, J. A. (2009). Global gene expression in recombinant and non-recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* in three different metabolic states. *Biotechnology Advances* **27**, 1092-1117.
- Engel, R. H., and Evens, A. M. (2006). Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci* **11**, 300-312.
- Ewing, J. F., and Janero, D. R. (1995). Microplate Superoxide Dismutase Assay Employing a Nonenzymatic Superoxide Generator. *Analytical Biochemistry* **232**, 243-248.

- FERREIRA, T. C. (2006). Clonagem e Expressão do Fator 1 Humano Induzível por Hipóxia (HIF-1) na Levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Tese de Doutorado*.
- Ferreira, T. C., Hertzberg, L., Gassmann, M., and Campos, É. G. (2007). The yeast genome may harbor hypoxia response elements (HRE). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **146**, 255-263.
- Flattery-O'Brien, J., Collinson, L. P., and Dawes, I. W. (1993). *Saccharomyces Cerevisiae* has an Inducible Response to Menadione which differs from that to Hydrogen Peroxide. *Journal of General Microbiology* **139**, 501-507.
- Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A. C., Lopes, S. C. D. N., Antunes, F., Cyrne, L., and Marinho, H. S. (2008). H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 1141-1147.
- Fong, C. S., Temple, M. D., Alic, N., Chiu, J., Durchdewald, M., Thorpe, G. W., Higgins, V. J., and Dawes, I. W. (2008). RESEARCH ARTICLE: Oxidant-induced cell-cycle delay in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the SWI6 transcription factor. *FEMS Yeast Research* **8**, 386-399.
- Fuge, E. K., Braun, E. L., and Werner-Washburne, M. (1994). Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **176**, 5802-13.
- Galanis, A., Pappa, A., Giannakakis, A., Lanitis, E., Dangaj, D., and Sandaltzopoulos, R. (2008). Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. *Cancer Letters* **266**, 12-20.
- Galgańska, H., Karachitos, A., Baranek, M., Budzińska, M., Jordán, J., and Kmita, H. (2010). Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells following exposure to H₂O₂ and protective effect of minocycline depend on the presence of VDAC. *European Journal of Pharmacology* **643**, 42-47.
- Gellissen, G., and Hollenberg, C. P. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*- a review. *Gene* **190**, 87-97.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B., and Labarre, J. (1998). The H₂O₂ Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 22480-22489.
- Gonzalez, R., Andrews, B. A., Molitor, J., and Asenjo, J. A. (2003). Metabolic analysis of the synthesis of high levels of intracellular human SOD in *Saccharomyces cerevisiae* rhSOD 2060 411 SGA122. *Biotechnology and Bioengineering* **82**, 152-169.
- Görgens, J. F., van Zyl, W. H., Knoetze, J. H., and Hahn-Hägerdal, B. (2001). The metabolic burden of the PGK1 and ADH2 promoter systems for heterologous xylanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. *Biotechnology and Bioengineering* **73**, 238-245.

- Gralla, E. B., and Valentine, J. S. (1991). Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *Journal of Bacteriology* **173**, 5918-5920.
- Grant, C., MacIver, F., and Dawes, I. (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **29**, 511-515.
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* **106**, 207-212.
- Haddad, J. J. (2002). The involvement of l- γ -glutamyl-l-cysteinyl-glycine (glutathione/GSH) in the mechanism of redox signaling mediating MAPKp38-dependent regulation of pro-inflammatory cytokine production. *Biochemical Pharmacology* **63**, 305-320.
- Haddad, J. J., and Harb, H. L. (2005). Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *International immunopharmacology* **5**, 461-483.
- Haddad, J. J. E., Olver, R. E., and Land, S. C. (2000). Antioxidant/Pro-oxidant Equilibrium Regulates HIF-1 α and NF- κ B Redox Sensitivity: EVIDENCE FOR INHIBITION BY GLUTATHIONE OXIDATION IN ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 21130-21139.
- Hamanaka, R. B., and Chandel, N. S. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Current opinion in cell biology* **21**, 894-899.
- Hashim, Z., Teoh, S. T., Bamba, T., and Fukusaki, E. (2014). Construction of a metabolome library for transcription factor-related single gene mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chromatography B* **966**, 83-92.
- Hatem, E., Berthonaud, V., Dardalhon, M., Lagniel, G., Baudouin-Cornu, P., Huang, M.-E., Labarre, J., and Chédin, S. (2014). Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **67**, 103-114.
- Herbette, S., Roeckel-Drevet, P., and Drevet, J. R. (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS Journal* **274**, 2163-2180.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., and Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1780**, 1217-1235.
- Höpfl, G., Ogunshola, O., and Gassmann, M. (2004). "HIFs and tumors—causes and consequences."
- Hou, Z., Nie, C., Si, Z., and Ma, Y. (2013). Deferoxamine enhances neovascularization and accelerates wound healing in diabetic rats via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Diabetes Research and Clinical Practice* **101**, 62-71.
- Hurst, H. C. (1996). Transcription factors as drug targets in cancer. *European Journal of Cancer* **32**, 1857-1863.

- Ikeda, Y., Tajima, S., Yoshida, S., Yamano, N., Kihira, Y., Ishizawa, K., Aihara, K.-i., Tomita, S., Tsuchiya, K., and Tamaki, T. (2011). Deferoxamine promotes angiogenesis via the activation of vascular endothelial cell function. *Atherosclerosis* **215**, 339-347.
- Inoue, Y., Kobayashi, S., and Kimura, A. (1993). Cloning and phenotypic characterization of a gene enhancing resistance against oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **75**, 327-331.
- Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A. (1995). Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **368**, 73-76.
- Jackson, A. L., and Loeb, L. A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **477**, 7-21.
- Jamieson, D. J. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* **174**, 6678-81.
- Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1511-1527.
- Kaluz, S., Kaluzová, M., and Stanbridge, E. J. (2008). Regulation of gene expression by hypoxia: Integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clinica Chimica Acta* **395**, 6-13.
- Karamouzis, M. V., Gorgoulis, V. G., and Papavassiliou, A. G. (2002). Transcription Factors and Neoplasia. *Clinical Cancer Research* **8**, 949-961.
- Klopotowski, T., and Wiater, A. (1965). Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **112**, 562-566.
- Klöppel, C., Michels, C., Zimmer, J., Herrmann, J. M., and Riemer, J. (2010). In yeast redistribution of Sod1 to the mitochondrial intermembrane space provides protection against respiration derived oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications* **403**, 114-119.
- Koh, M. Y., Spivak-Kroizman, T. R., and Powis, G. (2008). HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends in biochemical sciences* **33**, 526-534.
- Lapshina, E. A., Zavodnik, I. B., Labieniec, M., Rękawiecka, K., and Bryszewska, M. (2005). Cytotoxic and genotoxic effects of tert-butyl hydroperoxide on Chinese hamster B14 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **583**, 189-197.
- Li, Y., Zhang, P. J., Jin, C., Zhou, B., Liu, X. Y., Tao, L. D., and Feng, M. (2011). Protective Effects of Deferoxamine Mesylate Preconditioning on Pancreatic Tissue in Orthotopic Liver Autotransplantation in Rats. *Transplantation Proceedings* **43**, 1450-1455.

- Limón-Pacheco, J., and Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **674**, 137-147.
- Liu, H., and Kehrer, J. P. (1996). The reduction of glutathione disulfide produced by t-butyl hydroperoxide in respiring mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* **20**, 433-442.
- Lushchak, V., Semchyshyn, H., Mandryk, S., and Lushchak, O. (2005). Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **441**, 35-40.
- Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **153**, 175-190.
- Manolescu, B., Oprea, E., Busu, C., and Cercasov, C. (2009). Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway. *Biochimie* **91**, 1347-1358.
- Marengo, B., De Ciucis, C., Verzola, D., Pistoia, V., Raffaghello, L., Patriarca, S., Balbis, E., Traverso, N., Cottalasso, D., Pronzato, M. A., Marinari, U. M., and Domenicotti, C. (2008). Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 474-482.
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., and Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology* **2**, 535-562.
- Martin, C. E., and Scheinbach, S. (1989). Expression of proteins encoded by foreign genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Advances* **7**, 155-185.
- Mazure, N. M., Brahim-Horn, M. C., Berta, M. A., Benizri, E., Bilton, R. L., Dayan, F., Ginouvès, A., Berra, E., and Pouysségur, J. (2004). HIF-1: master and commander of the hypoxic world: A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochemical Pharmacology* **68**, 971-980.
- Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 17205-8.
- Metodiewa, D., and Brian Dunford, H. (1991). 3-aminotriazole is a substrate for lactoperoxidase but not for catalase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **180**, 585-590.
- Morano, K. A., Grant, C. M., and Moye-Rowley, W. S. (2012). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 1157-1195.
- Neph, S., Stergachis, Andrew B., Reynolds, A., Sandstrom, R., Borenstein, E., and Stamatoyannopoulos, John A. (2012). Circuitry and Dynamics of Human Transcription Factor Regulatory Networks. *Cell* **150**, 1274-1286.
- Ng, C.-H., Tan, S.-X., Perrone, G. G., Thorpe, G. W., Higgins, V. J., and Dawes, I. W. (2008). Adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of

- NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 1131-1145.
- Nicholls, P. (1962). The reaction between aminotriazole and catalase. *Biochimica et Biophysica Acta* **59**, 414-420.
- Ong, S.-G., and Hausenloy, D. J. (2012). Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection. *Pharmacology & Therapeutics* **136**, 69-81.
- Papavassiliou, A. G. (1998). Transcription-factor-modulating agents: precision and selectivity in drug design. *Molecular Medicine Today* **4**, 358-366.
- Piret, J.-P., Mottet, D., Raes, M., and Michiels, C. (2002). Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochemical Pharmacology* **64**, 889-892.
- Prévéral, S., Ansoborlo, E., Mari, S., Vavasseur, A., and Forestier, C. (2006). Metal(loid)s and radionuclides cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Role of YCF1, glutathione and effect of buthionine sulfoximine. *Biochimie* **88**, 1651-1663.
- Raval, J., Lyman, S., Nitta, T., Mohuczy, D., Lemasters, J. J., Kim, J.-S., and Behrns, K. E. (2006). Basal reactive oxygen species determine the susceptibility to apoptosis in cirrhotic hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine* **41**, 1645-1654.
- Rezvani, H. R., Ali, N., Nissen, L. J., Harfouche, G., de Verneuil, H., Taieb, A., and Mazurier, F. (2011). HIF-1[α] in Epidermis: Oxygen Sensing, Cutaneous Angiogenesis, Cancer, and Non-Cancer Disorders. *J Invest Dermatol* **131**, 1793-1805.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D. W., Smyth, C., Laing, N. G., Soriano, E., Pericak-Vance, M. A., Haines, J., Rouleau, G. A., Gusella, J. S., Horvitz, H. R., and Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62.
- Rover Júnior, L., Höehr, N. F., Vellasco, A. P., and Kubota, L. T. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova* **24**, 112-119.
- Ruas, J. L., and Poellinger, L. (2005). Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator. Vol. 16, pp. 514-522. Elsevier.
- Sadowska-Bartos, I., Pączka, A., Mołoń, M., and Bartosz, G. (2013). Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **13**, 820-830.
- Salo, D. C., Lin, S. W., Pacifici, R. E., and Davies, K. J. A. (1988). Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* **5**, 335-339.

- Scarbaci, K., Troiano, V., Micale, N., Ettari, R., Tamborini, L., Di Giovanni, C., Cerchia, C., Grasso, S., Novellino, E., Schirmeister, T., Lavecchia, A., and Zappalà, M. (2014). Identification of a new series of amides as non-covalent proteasome inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **76**, 1-9.
- Schmidt, M., and Finley, D. (2014). Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**, 13-25.
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current Opinion in Genetics & Development* **8**, 588-594.
- Semenza, G. L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochemical Pharmacology* **59**, 47-53.
- Semenza, G. L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current opinion in cell biology* **13**, 167-171.
- Semenza, G. L. (2007). Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug discovery today* **12**, 853-859.
- Semenza, G. L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development* **20**, 51-56.
- Semenza, Gregg L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* **148**, 399-408.
- Sevast'syanovich, Y., Alfasi, S., and Cole, J. (2009). Recombinant protein production: a comparative view on host physiology. *New Biotechnology* **25**, 175-180.
- Sha, W., Martins, A. M., Laubenbacher, R., Mendes, P., and Shulaev, V. (2013). The Genome-Wide Early Temporal Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Oxidative Stress Induced by Cumene Hydroperoxide. *PLoS ONE* **8**, e74939.
- Sousa-Lopes, A., Antunes, F., Cyrne, L., and Marinho, H. S. (2004). Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Letters* **578**, 152-156.
- Speer, R. E., Karuppagounder, S. S., Basso, M., Sleiman, S. F., Kumar, A., Brand, D., Smirnova, N., Gazaryan, I., Khim, S. J., and Ratan, R. R. (2013). Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by "antioxidant" metal chelators: From ferroptosis to stroke. *Free Radical Biology and Medicine* **62**, 26-36.
- Spitz, F., and Furlong, E. E. M. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet* **13**, 613-626.
- Stein, M. L., and Groll, M. (2014). Applied techniques for mining natural proteasome inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**, 26-38.

- Stowe, D. F., and Camara, A. K. S. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxidants & redox signaling* **11**, 1373-1414.
- Tao, R., Coleman, M. C., Pennington, J. D., Ozden, O., Park, S.-H., Jiang, H., Kim, H.-S., Flynn, C. R., Hill, S., and Hayes McDonald, W. (2010). Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Molecular cell* **40**, 893-904.
- Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**, L1005-L1028.
- Tudek, B., Winczura, A., Janik, J., Siomek, A., Foksinski, M., and Oliński, R. (2010). Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *American journal of translational research* **2**, 254.
- Ursini, F., and Maiorino, M. (2013). Glutathione Peroxidases. In "Encyclopedia of Biological Chemistry" (W. J. Lennarz and M. D. Lane, eds.), pp. 399-404. Academic Press, Waltham.
- Vasylykiv, O. Y., Kubrak, O. I., Storey, K. B., and Lushchak, V. I. (2011). Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **101**, 1-5.
- Veenstra, G. J. C., and Wolffe, A. P. (2001). Gene-selective developmental roles of general transcription factors. *Trends in biochemical sciences* **26**, 665-671.
- Waris, G., and Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* **5**, 14.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. k. M., Budinger, G. R. S., and Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 8788-8793.
- Weldrick, D. P., Chodacka, B., Vogt, R., and Steenkamp, D. J. (1999). The effect of buthionine sulfoximine on the growth of *Leishmania donovani* in culture. *FEMS Microbiology Letters* **173**, 139-146.
- Welker, A. F. (2009). Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres. *Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.* .
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., and Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **57**, 383-401.
- Wu, Y., Li, X., Xie, W., Jankovic, J., Le, W., and Pan, T. (2010). Neuroprotection of deferoxamine on rotenone-induced injury via accumulation of HIF-1 α and induction of autophagy in SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International* **57**, 198-205.

- Xia, Y., Choi, H.-K., and Lee, K. (2012). Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 24-40.
- Ządzinski, R., Fortuniak, A., Bartosz, G., Bilinski, T., and Grey, M. (1998). Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: Activation by conjugation with glutathione. *IUBMB Life* **44**, 747-759.
- Zaret, K. S., and Carroll, J. S. (2011). Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes & Development* **25**, 2227-2241.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., and Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 337-349.
- Zitomer, R. S., and Lowry, C. V. (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **56**, 1-11.