

Spirulina platensis* E RESTRIÇÃO CALÓRICA FRENTE AO ÍON FERROSO NA LONGEVIDADE DE *Saccharomyces cerevisiae

Marina Zanco Pezzini

Acadêmica do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo - UPF
mah_pezzini@hotmail.com

Darqui Thais Decosta

Acadêmica do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo – UPF
darquithais@gmail.com

Fábia Benetti

Professora pesquisadora da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões -
URI
fabia_b.14@hotmail.com

Telma E. Bertolin

Professora pesquisadora do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo -
UPF
telma@upf.br

Resumo. *O processo de envelhecimento é acompanhado por mudanças na atividade de células, tecidos e órgãos. O acúmulo progressivo destas alterações é associado ao desequilíbrio na homeostase do organismo em relação a determinados metais. Terapias antioxidantes podem interferir neste processo, reduzindo danos causados pelo acúmulo de metais tóxicos. A *Spirulina platensis* destaca-se por apresentar propriedades como antioxidante natural. A restrição calórica (RC) tem sido identificada com potencial em retardar patologias associadas ao envelhecimento. Seus benefícios podem estar relacionados à ativação do gene *Silent Information Regulator2*. Neste contexto, objetivou-se avaliar o potencial do extrato de *Spirulina platensis* (ESP) e da RC, em *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ao estresse por Fe^{2+} . Cepas de *S. cerevisiae*, controle e deletadas ao gene *sir2* (*sir2Δ*) foram cultivadas em meio YPD2% glicose e sobre RC (YPD 0,5 % glicose). Em seguida foram expostas ou não a 1mM de ferro e a 0,8 mg/mL de ESP durante 1h e posteriormente submetidas ao envelhecimento celular. As células foram coletadas para análises de sobrevivência*

*celular. Observou-se redução na sobrevivência celular nas cepas *sir2Δ*. Este efeito foi significativo antes e após o envelhecimento para os tratamentos Padrão, RC e RC + Fe^{2+} . Concluímos que a deleção de *sir2Δ* diminui a sobrevivência em todos os tratamentos estudados. As terapias empregadas mostraram efeito protetor relativo à toxicidade induzida pelo ferro.*

Palavras-chave: *Antioxidantes. Levedura. Ferro.*

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas destacam a existência de substâncias e comportamentos que podem ter efeitos benéficos sobre a longevidade. Estes estudos sugerem que os benefícios antienvhecimento ou relativo à proteção a doenças podem ser alcançados pela prática de exercício físico, restrição calórica, e consumo de antioxidantes (BRAR et al., 2009). Os danos celulares podem ser provocados por espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio. Metais de transição como o ferro, podem doar ou aceitar elétrons durante as reações intracelulares, catalisando a

formação de radicais livres (RL) como na reação de fenton. Desta forma o ferro por aumentar a produção de RL, pode levar a danos no DNA e proteínas, bem como na eventual degeneração dos neurônios. Da cianobactéria *Spirulina platensis* se extrai a ficobiliproteína ficocianina, que apresenta capacidade antioxidante, atuando no aumento da imunidade, induzindo a apoptose em células cancerígenas, como na leucemia (VASCONCELLOS, 2007).

Uma área ativa de pesquisa é a influência da dieta na longevidade, neste campo, a restrição calórica, tem sido repetidamente demonstrada como um fator crucial para o aumento da expectativa de vida e redução de doenças relacionadas com a idade (BRAR et al., 2009).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada um dos modelos de sistema eucariótico unicelular mais importante para estudos relacionados ao envelhecimento, sob o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos mais utilizados em testes biológicos. Neste contexto, objetiva-se avaliar a capacidade antioxidante do extrato de *Spirulina platensis*, e da RC frente aos danos causados pelo Fe^{2+} , na longevidade de *Saccharomyces cerevisiae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Modelo Experimental

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2Δ* e controle foram obtidas da *Euroscarf*, Frankfurt, Germany. O Quadro 1 apresenta as linhagens que foram utilizadas nos experimentos.

Quadro 1. Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* prevista para o estudo

Cepas	Genótipos
*BY4741	MAT A; his 3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0

<i>Sir 2</i>	Isogênica a by4741 exceto o gene <i>Sir 2::kmx4</i>
--------------	---

*Cepa Controle (C).

As células foram retiradas de um repique fresco em meio sólido YPD 2 %, e cultivadas em erlenmeyers, contendo 20 % do seu volume preenchido por meio YPD 2 % ou YPD 0,5 % (meio que caracteriza a restrição calórica). Após a realização do inóculo, as culturas foram incubadas a 28 °C em agitador orbital ajustado para 160 rpm até atingirem a primeira fase exponencial de crescimento (entre 0,5 e 0,9 mg de peso seco de células/mL).

Crescimento Celular

A avaliação do crescimento celular foi determinada em espectrofotômetro, através da medida da absorbância a 570 nm de uma suspensão de células convertida em concentração de células (mg de peso seco de células/mL).

Extrato aquoso de *Spirulina platensis*

A cianobactéria *Spirulina platensis* é proveniente do Laboratório de Engenharia Bioquímica do curso de Engenharia de Alimentos da FURG-RS. O extrato da *Spirulina platensis* foi obtido através do processo de congelamento e descongelamento. Para a extração foi utilizada 1 g da microalga e adicionados 30 mL de água destilada estéril, com posterior acondicionamento em embalagem plástica com tampa. Estas embalagens foram congeladas a 0 °C por 3 h e após esse período foram descongeladas a 4 °C (COSTA et al., 2005). Os processos de congelamento e descongelamento aconteceram de forma sucessiva por três vezes. Após estas amostras foram submetidas à centrifugação a 6000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi extraído, sendo este o extrato de *Spirulina platensis*.

Delimitação Experimental

O delineamento experimental foi realizado conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2. Delineamento experimental para verificação do efeito da RC e Extrato de *Spirulina platensis* no cultivo da *Saccharomyces cerevisiae*

Tratamentos	Cultivos
01	Padrão (P)
02	Restrição calórica (RC)
03	Padrão acrescido de extrato de <i>Spirulina platensis</i> (P _{Sp})
04	Padrão + Íon Fe ²⁺ (PFe ²⁺)
05	Restrição calórica + Íon Fe ²⁺ (RCFe ²⁺)
06	Padrão acrescido de extrato de <i>Spirulina platensis</i> + Íon Fe ²⁺ (P _{Sp} Fe ²⁺)

A condição experimental prevista no Quadro 2 foi aplicada para as cepas apresentadas no Quadro 1.

Simulação do envelhecimento cronológico

Aproximadamente 30 mg de células foram coletadas e lavadas duas vezes com água destilada estéril. Após a última lavagem, o centrifugado foi ressuspensão em 10 mL de água destilada estéril e transferido para um erlenmeyer de 50 mL. Este erlenmeyer foi, então, incubado a 37 °C em um agitador rotatório ajustado para 160 rpm pelo tempo necessário para a realização dos experimentos.

Sobrevivência celular

A sobrevivência celular foi analisada através de inoculação em superfície em meio

sólido YPD 2 %, antes e após envelhecimento (ELEUTHERIO et al., 1995). As placas foram incubadas a 28 °C por 72 h e o número de colônias contado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, houve a redução no percentual de sobrevivência celular quando as cepas (WT e sir2) foram expostas ao Fe²⁺. A diminuição do crescimento celular verificada evidencia a capacidade de toxicidade deste íon, sendo responsável por danos aos componentes celulares.

Na figura 1, é possível observar os resultados de sobrevivência celular antes do envelhecimento.

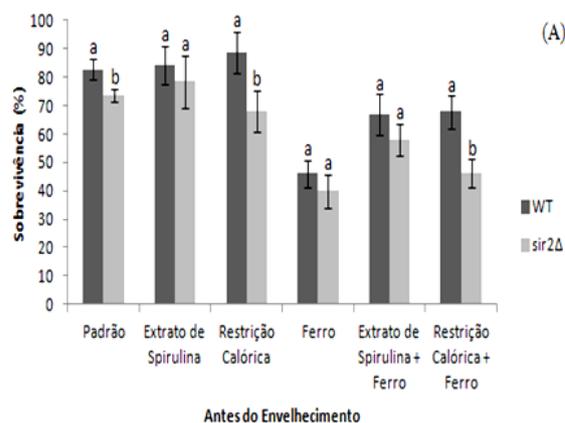


Figura 1. Resultados de sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* cepas controle (WT) e deletadas ao gene *sir2Δ* submetida ou não aos tratamentos adaptativos com extrato de *Spirulina platensis*, e Fe²⁺ antes do envelhecimento.

Na figura 2, observam-se os resultados de sobrevivência celular após o envelhecimento.

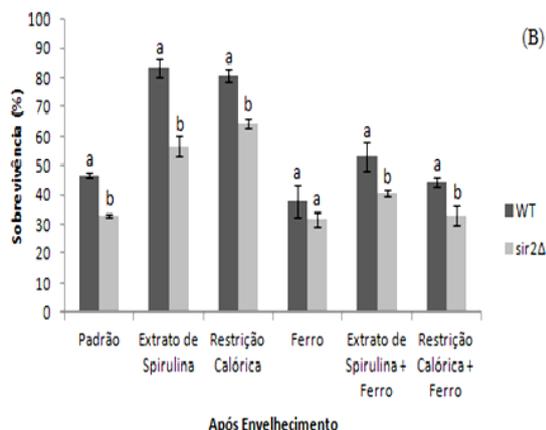


Figura 2. Resultados de sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* cepas controle (WT) e deletadas ao gene *sir2Δ* submetida ou não aos tratamentos adaptativos com extrato de *Spirulina platensis*, e Fe^{2+} após o envelhecimento.

Através das figuras, foi possível observar que, a deleção de *sir2Δ* foi danosa às células de *Saccharomyces cerevisiae*, quando comparadas com a cepa WT. Observa-se também, que o extrato de *S. platensis* mostrou comportamento similar à restrição calórica o que sugere possível mimetismo das terapias na redução dos danos causados pelo metal em relação ao envelhecimento.

É visível que, após o envelhecimento, a sobrevivência celular diminuiu consideravelmente em relação aos tratamentos sem envelhecimento, principalmente nas cepas WT.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células de *Saccharomyces cerevisiae* quando expostas ao íon ferroso apresentam diminuição da sobrevivência celular. Essa redução é mais acentuada as cepas deletadas ao gene *sir2Δ*, o que demonstra a importância deste gene para a longevidade celular.

As terapias de RC e extrato de *Spirulina platensis* quando aplicadas as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudadas (WT e

sir2Δ), atenuaram a ação do íon ferroso, aumentando a sobrevivência celular. Desta forma, demonstraram-se terapias promissoras para atenuar danos induzidos pelo ferro.

Agradecimentos

CAPES, Universidade de Passo Fundo e Universidade Federal do Rio Grande.

4. REFERÊNCIAS

BRAR, S. et al. Iron Accumulation in the Substantia Nigra of Patients With Alzheimer Disease and Parkinsonism. *Archives of Neurology*, v. 66, n. 3, p.371-374, 2009.

COSTA, J. A. V. et al. Purification of *Spirulina platensis* Phycocyanin. *Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard*, v. 14, p. 63-64, 2005.

ELEUTHERIO, E. C. A. et al. Effect of trehalose during stress conditions in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 36, p. 1217-1223,1995.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.