

RETARDO DO ENVELHECIMENTO CRONOLÓGICO EM CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae* MUTANTES OU NÃO AO GENE SIR UTILIZANDO TRATAMENTOS DE FICOCIANINA E RESTRIÇÃO CALÓRICA.

Darqui Thais Decosta

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

Marina Zanco Pezzini

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

Marta Santolin

Pesquisadora na Universidade de Passo Fundo-UPF
martasantolin@hotmail.com

Telma Elita Bertolin

Professora e Pesquisadora da Universidade de Passo Fundo-UPF
tela@upf.br

Resumo. *O processo de envelhecimento é acompanhado por mudanças na atividade do organismo. A restrição calórica vem sendo relatada por prevenir o aparecimento de doenças ligadas ao envelhecimento. O uso de moléculas com capacidade antioxidante recebe destaque, pois estudos sugerem uma relação inversa na ingestão de compostos antioxidantes. Neste contexto, o trabalho objetivou analisar o papel da ficocianina e da restrição calórica no envelhecimento cronológico da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizou-se cepas de leveduras controle e deletadas aos genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*. As células foram crescidas em meio YPD 2 % glicose, YPD 2 % glicose + ficocianina, YPD 0,5 % glicose. As cepas foram submetidas a 24 h de envelhecimento e coletadas para análises de sobrevivência celular. O uso da restrição calórica e ficocianina mostrou benefício no percentual de sobrevivência. Os resultados apontam que a cepa deletada ao gene *sir2* mostrou maior sensibilidade aos tratamentos com RC e ficocianina.*

Palavras-chave: *Antioxidante. Levedura. Sirtuínas.*

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, um dos principais focos da pesquisa relacionados ao processo do envelhecimento tem sido direcionado para a compreensão dos mecanismos que fundamentam o prolongamento da vida. A interação entre o genoma e os fatores estocásticos resulta a maior ou menor velocidade de envelhecimento do organismo onde, a compreensão do fenômeno de envelhecimento passa pelo contexto dos mecanismos biológicos específicos, manifestando-se através de envelhecimento celular, tecidual e orgânico (FARINATTI, 2002). O envelhecimento implica em deterioração progressiva, tempo-dependente, do organismo em resposta adaptativa às mudanças ambientais. Trata-se de alterações em nível celular, com diminuição da capacidade dos órgãos em executar suas funções normais, resultando em doença e morte.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas em larga escala para estudos dos fenômenos da bioquímica, biologia celular e molecular. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica e de detoxificação. Apesar das diferenças de complexidade entre leveduras e humanos, o estudo do envelhecimento em leveduras tem mostrado informações importantes em vias que modulam o processo do envelhecimento em mamíferos. Uma das intervenções investigadas para aumentar o tempo de vida em mamíferos é a restrição calórica (RC), uma redução na ingestão de calorias, sem deficiências nutricionais. Esse modelo de dieta prolonga o tempo de vida, atenua os efeitos indesejados do avançar da idade e retarda o aparecimento de patologias relacionadas ao envelhecimento, tais como câncer, a diabetes e aterosclerose, doenças neurodegenerativas.

A conservação dos membros da família das sirtuínas em genes de leveduras indica que, no homem, estas proteínas desempenham papéis fisiológicos vitais. O desenvolvimento de tratamentos específicos para retardar os efeitos do envelhecimento é atualmente um desafio para a medicina preventiva.

O efeito antioxidante deve-se principalmente à *ficocianina*, seu principal pigmento (BHAT, BERTOLIN e COSTA, 2010). A ficocianina apresenta propriedades nutricionais e funcionais e tem sido utilizada em diferentes modelos experimentais, corroborando com resultados efetivos na inibição da replicação de alguns vírus, no tratamento de cânceres, nas dislipidemias e diabetes, como antiinflamatório e como redutor de peso.

O presente trabalho objetivou analisar o papel da ficocianina e da restrição calórica em sinergismo e de forma não sinérgica no envelhecimento cronológico celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental de células eucarióticas.

2. MATERIAL E METODOS

Modelo experimental

Foram utilizadas cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* deletadas, ou não, para os genes *sir*. As linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram mantidas em meio YPD 2%. A manutenção dos micro-organismos foi realizada através de repiques periódicos em meio YPD 2 % glicose.

As cepas mutantes foram obtidas a partir da inserção do gene de resistência a geneticina no gene de interesse. Desta forma o gene alvo é interrompido e para que a pressão seletiva fosse mantida adicionou-se 0,02 % de geneticina no meio YPD 2 % glicose.

Meios de cultivo

As células retiradas de um repique fresco em meio sólido YPD 2 %, foram cultivadas em erlenmeyers contendo 20 % do seu volume preenchido por meio YPD 2 % (2 % glicose, 2 % peptona, 1 % extrato de levedura) ou YPD 0,5 % (0,5 % glicose, 2 % peptona, 1 % extrato de levedura) a 28 °C e 160 rpm até a primeira fase exponencial de crescimento.

Crescimento celular

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

Extração da ficocianina

A ficocianina foi extraída pelo processo de congelamento/descongelamento. Para tanto, foram utilizadas 1 g da microalga *Spirulina platensis* em pó e adicionados 30 mL de água e submetidos à embalagens plásticas com tampa. As suspensões foram

submetidas ao processo de ruptura celular por congelamento a 0 °C por cerca de 3 h e após esse período foram conduzidas ao refrigerador para o descongelamento a 4 °C.

Os ciclos de congelamento e descongelamento aconteceram de forma sucessiva por 3 vezes. As amostras foram submetidas à centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi extraído, sendo este o extrato de ficocianina.

Viabilidade celular

A sobrevivência celular foi avaliada através de plaqueamento em triplicatas em meio sólido YPD 2%. As colônias foram contadas após 72 h de crescimento em estufa a 28°C. O percentual de sobrevivência foi calculado a partir da razão entre o número de colônias obtidas em meio YPD 2% após e antes de 24 h de envelhecimento celular (MANARINNO, et al., 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A longevidade celular foi verificada através do percentual de células viáveis (percentual de sobrevivência) após o processo de envelhecimento.

Observou-se que o percentual de sobrevivência foi superior nas cepas deletadas aos genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4* em relação à cepa controle.

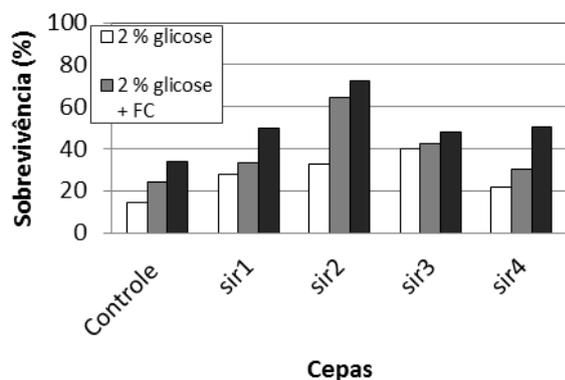


Figura 1 - Percentual de sobrevivência após 24

horas de envelhecimento para as cepas controle e deletadas aos genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*.

No cultivo de células em 2 % de glicose acrescidas de ficocianina, observa-se que o percentual de sobrevivência também foi superior nas cepas deletadas para os genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4* em relação à cepa controle. Quando analisamos o cultivo com 0,5 % de glicose (RC) para os resultados do percentual de sobrevivência, verificamos que as cepas deletadas aos genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4* apresentam superioridade em relação à cepa controle.

Quando analisamos cada cepa de forma individual, nos cultivos 2% de glicose + ficocianina (P + FC) e 2% glicose (P), verificamos que o resultado mostrou que no envelhecimento de 24 h, todas as cepas cultivadas no tratamento 2 % de glicose + ficocianina (P + FC), mostraram percentual de sobrevivência superior aos do cultivo com 2% glicose (P).

Verificou-se que o percentual de sobrevivência foi superior nas células cultivadas em 0,5 % de glicose (RC), nos mostra que o cultivo com 2% de glicose e adição de ficocianina (P + FC) apresentou-se superior às células do cultivo com 2 % glicose (P), porém, inferior quando comparadas às células crescidas em 0,5 % glicose (RC). Na cepa controle, houve diferença significativa entre células crescidas em 2 % (P) e 0,5 % (RC). Não diferiram os experimentos com ficocianina, com ou sem restrição calórica, da cepa controle. Já na cepa deletada ao gene *sir1*, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com e sem ficocianina, quando crescidas em 2 % glicose (P + FC) e (P), porém os mesmos diferiram das células submetidas à 0,5 % glicose (RC).

Na cepa deletada para o gene *sir2* o tratamento com ficocianina mostrou um

aumento significativo em relação às células crescidas em 2 % glicose. Ao comparar as células crescidas em 2% glicose com as células crescidas e 0,5 %, verificou-se diferença significativa.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na cepa deletada para o gene *sir3*.

A cepa deletada ao gene *sir4*, percebemos que, assim como na cepa *sir1*, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos submetidos ou não à ficocianina.

Diante da apresentação destes resultados, podemos discutir que o percentual de sobrevivência foi aumentado frente aos tratamentos com ficocianina e com restrição calórica nas cepas deletadas ao gene *sir1*, *sir2* e *sir4* e na cepa controle. Foi possível observar que a deleção do gene *sir3*, foi a que apresentou menor influência no percentual de sobrevivência frente aos tratamentos com ficocianina e restrição calórica.

A cepa deletada ao gene *sir2* foi a que melhor reconheceu as terapias com ficocianina e restrição calórica, mostrando diferenças significativas no percentual de sobrevivência.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O envelhecimento cronológico da levedura serve como parâmetro para o entendimento do envelhecimento em células humanas. O tempo de vida cronológico é monitorado através do crescimento celular, quando as células entram em fase exponencial (LONGO et al., 1996; GUTIERREZ et al., 2010). No presente estudo buscamos analisar a longevidade através do percentual de sobrevivência das cepas submetidas ao envelhecimento celular. Estudos buscando elucidar os mecanismos da longevidade têm avaliado os efeitos benéficos de compostos antioxidantes.

A literatura mostra que a *Spirulina* e seus pigmentos antioxidantes podem prevenir ou inibir o câncer em seres

humanos ou animais. Os estudos *in vitro* sugerem que os polissacarídeos da *Spirulina* aumentam a atividade enzimática do núcleo da célula e reparo na síntese do DNA (PANG et al., 1998; ESTRADA, BESCÓS e FRESNO (2001)

Agradecimentos: CAPES. Universidade de Passo Fundo e Universidade de Rio Grande.

4. REFERÊNCIAS

BERTOLIN, T. E.; FARIAS, D.; GUARIENTI, C.; PETRY, F. T. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Antioxidant Effect of Phycocyanin on Oxidative Stress Induced with Monosodium Glutamate in Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, p. 733-738, 2011.

FARINATTI, P. T. V. Teorias biológicas do envelhecimento do genético ao estocástico. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*, v. 8, n. 4, p. 129-132, 2002.

LONGO, V. D., GRALLA, E. B., VALENTINE, J. S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 21, p. 12275-12280, 1996.

MANNARINO, S. C.; ARANHA, J. N.; PEREIRA, M. D.; FERREIRA M. P.; ELEUTHERIO, E. C. **Requirement of glutathione for Sod I activation during lifesoan extension.** *Yeast*, v. 28. p. 9 – 25, 2011.

**XXV CONGRESSO REGIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E
TECNOLÓGICA EM ENGENHARIA – CRICTE 2013**
11 a 13 de setembro de 2013 – Passo Fundo - RS