

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

Tese de Doutorado

Resposta da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse oxidativo induzido pelo
cádmio

Luciana Mara Costa Moreira

BELO HORIZONTE

2011

Luciana Mara Costa Moreira

**Resposta da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse oxidativo
induzido pelo cádmio**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia

Orientador:

Dra. Maria José Neves (CDTN/CNEN)

Co-orientadores:

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (ICB/UFMG)

Prof. Dr. Flaviano Martins dos Santos

Belo Horizonte

2011

**“A vida só pode ser compreendida olhando para trás, mas só pode ser vivida
olhando-se para frente”**

Sören kierkegaard

*“Aos meus avós por criarem o caminho,
Aos meus pais por me ensinarem a andar,
Ao Túlio por caminhar ao meu lado”*

Dedico-lhes!

À minha orientadora, *Dra. Maria José Neves*, “Mazé”... por sempre me fazer acreditar que iria dar certo, quando eu queria desistir... **Você fez toda a diferença mais uma vez!**

Agradecimentos

A Deus, por cada um dos dias vividos, pelas experiências boas e também pelas ruins que nos permitem crescer durante o curso da existência e principalmente por colocar em minha vidas pessoas especiais que me acompanharam em cada momento dessa tese.

À *Maria José Neves*, que nestes oito anos de convivência esteve sempre ao meu lado! Nunca me deixando desanimar, sempre tentando me entender. Tendo a palavra certa na hora certa, mesmo quando estas palavras lhe faltavam. Obrigada por me apoiar em mais uma etapa da minha vida, em mais uma conquista.

Aos meus pais pelo exemplo de vida em cada momento da minha vida. *Mamãe* minha anjinha na terra e *Papai* meu anjinho no céu. Vocês não me deram apenas a vida, vocês são minha vida!

Ao *Túlio*, obrigada por ser meu mundo, meu tudo e nada mais! Obrigada pelo companheirismo, pelo incentivo diário, por entender minha ausência em vários momentos, e principalmente por estar ao meu lado me completando!

“Ainda bem, que você vive comigo, por que senão, como seria essa vida... sei lá, sei lá!”

Ao meu co-orientador professor *Dr. Carlos Augusto Rosa*, pela oportunidade oferecida.

Ao meu co-orientador *Flaviano*, pelos almoços agradáveis, pelos ensinamentos e pela amizade que significa muito.

Cris, irmão que eu amo, obrigada pelo silêncio que diz muito!

Aos tios, tias, primos e primas... Obrigada por fazerem parte de minha vida em cada momento dessa dissertação, obrigada por compreender o mau humor, sorrir em cada vitória e entender minha ausência. *Família Costa* eu amo todos vocês! Em especial a *tia Fátima*, apoio essencial, força nas horas tristes, sorriso certo nos momentos difíceis e a *Dindinha Dora*, pelo exemplo de vida.

A família Bacelette: *Rita, Mauro, Fá, Luiz Otávio e Leticia*, pela torcida e pela alegria de sempre.

Aos meus padrinhos mágicos: *Fred*, irmão querido que me acompanhou durante todos estes anos, tanto no laboratório quanto em minha vida pessoal e *Bárbara*, minha amiga mais paciente e fiel escudeira, que sempre tentou tornar meus dias mais serenos e menos amargos. Vocês fizeram a diferença não só no doutorado, mas também em minha vida durante todos estes anos, eu amo vocês!

Ao pessoal do laboratório de Radiobiologia, que foram essenciais na realização deste trabalho, que além de amigos viraram irmãos, me acompanharam em cada vitória e em cada frustração... A *Marcella* e *Estefânia*, que desde o mestrado dividem comigo a alegria e a tristeza da pesquisa, e que entendem cada passo desses seis anos de estudo!

Meninas vocês moram no meu coração! *Dani* pelo carinho e por sempre estar disponível para minhas conversas complexas e pelo ombro sempre amigo, ao *Nino* que me ensinou com seu “vasto” conhecimento, ao *Paulo* por ser o melhor cozinheiro que minha cozinha já viu, *Thaíssa* por entender a minha necessidade de falar e de brigar, a *Pryscila Rodrigues, Marina, Izabela, Virgínia e Lucilene.*

“Amigos são anjos que nos levantam, quando nossas asas se esquecem como voar”

Aos alunos de iniciação que passaram pelo laboratório durante o período em que realizei meu doutorado *Raony, Larissa, Débora, Karine, Luiza* e que tanto me ajudaram.

A *Elô* e *Danny*, as amigas mais reais do mundo! Mesmo distante vocês me acompanharam em cada momento deste doutorado, me dando a força necessária para superar os momentos difíceis e me alegrando sempre!

Aos amigos queridos do CDTN que aqui estão ou que passaram por aqui deixando um gostinho de saudade: *Jaqueline, Nelson, Carol Bracini, Karynne, Val...*

Ariane sempre disposta a me ajuda e me entender!

Ao *Leandro* pela ajuda significativa com a estatística do trabalho, você fez uma excelente diferença ($p > 0,01$).

Ao *Bruno Guedes* pela grande ajuda com o microscópio e pela disponibilidade em me ensinar várias vezes o uso.

À equipe do reator (Fausto Moretti Junior, Amir Zacarias Mesquita, Paulo Fernandes de Oliveira, Luiz Otávio I. Sette Câmara, Wagner Souza) pela irradiação das amostras.

A *Maria Ângela de Barros Correia Menezes*, da Radioquímica pelas determinações das concentrações de cádmio incorporadas pelas células;

Ângela Maria Amaral pelas análises e também pela simpatia constante;

Ao *Wagner*, que desde a iniciação acompanha minha jornada.

A *Raquel Gouveia dos Santos* que acompanhou meu trabalho contribuindo com informações técnicas valiosas.

As bibliotecárias do CDTN, *Virgínia e Nívia*, por terem me recebido sempre com muita simpatia e alegria.

A todas as pessoas do CDTN que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

O cádmio (Cd^{+2}) é um metal não redox capaz de gerar radicais livres por via indireta, graças ao aumento do estresse oxidativo induzido pela depleção das defesas antioxidantes, em especial a ligação a grupamentos sulfidrílicos, grupamentos estes presentes em grande proporção na forma de glutatona. A geração de radicais livres (ROS) pode levar a alterações em lipídeos, DNA e proteínas. O aumento de ROS leva a modificações dos lipídeos presentes nas membranas celulares, um fenômeno conhecido como peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica tem como consequência a perda da homeostase iônica, caracterizada pela perda de potássio do meio intracelular que pode estar envolvida na quebra do equilíbrio hidro-osmótico, perda de fluídos internos e, combinados com outros fatores, podem levar as células à morte. A trealose é reconhecidamente um carboidrato importante na sobrevivência e proteção das células submetidas a diferentes estresses. A importância deste carboidrato na resposta ao estresse oxidativo induzido pelo cádmio não tem sido estudada em profundidade. Nosso estudo foi desenvolvido usando diferentes linhagens mutantes de *S. cerevisiae*. Os mutantes usados foram: *tps1Δ* (linhagem com deleção do gene TPS1 e portanto, incapaz de sintetizar trealose), *ahp1Δ* (linhagem com deleção do gene AHP1 que apresenta alto níveis de lipídeos peroxidados) e *trk1Δ* e *trk2Δ* (linhagens com deleção dos 2 maiores sistemas de transporte de potássio). Os resultados obtidos indicam que na ausência de trealose a célula foi capaz de captar cádmio em velocidade inferior àquela observada na linhagem BY4741-WT (linhagem controle), fato que implica em menor quantidade de cádmio incorporado, porém os danos resultantes foram muito maiores: maior peroxidação lipídica, menor quantidade de resíduos sulfidrílicos livres, maior perda de potássio, grande geração de radicais livres e maior proporção de células mortas por apoptose. Observamos também que as células que apresentam grande peroxidação lipídica (mutante *ahp1Δ*) não apresentam grande diferença com a linhagem BY4741-WT nos padrões, mas, são um pouco mais sensíveis ao cádmio em ensaios de tolerância. As linhagens com deleção em um dos transportadores de potássio, não apresentam diferenças significativas com relação à linhagem BY4741-WT. O conjunto de nossos resultados mostrou que a ausência da trealose em *S. cerevisiae* favoreceu a entrada das células em apoptose e que este processo foi intensificado pela presença de cádmio.

Abstract

Cadmium (Cd^{2+}) is a non-redox metal capable of generating free radicals by an indirect way, by depletion of antioxidant defenses and these way increased oxidative stress, particularly binding sulfhydryl groups, these groups present in glutathione. The generation of free radicals (ROS) can lead to changes in lipids, proteins and DNA. The increase in ROS leads to modification of lipids present in cell membranes, a phenomenon known as lipid peroxidation. Lipid peroxidation causes loss of ion homeostasis, characterized by loss of intracellular potassium that may be involved in the break of hydro-osmotic balance, loss of internal fluids that, combined with other factor, may cause cell to die. It is know that trehalose is a carbohydrate important in the survival and protection of cells submitted to different stresses. The importance of this carbohydrate in response to oxidative stress induced by cadmium, has been widely studied. Our study was developed using different mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The mutants were used: *tpsΔ* (strain with deletion of the TPS1 gene and therefore unable to synthesize trehalose, *ahp1Δ* (strain with gene deletion AHP1 presents high levels of lipid peroxidation) and *trk1Δ* and *trk2Δ* (strains with deletions of two major potassium transport systems). The results indicate that in the absence of trehalose the cell was able incorporate cadmium slower than strain *BY4741-WT* (strain control), this fact implies a lesser amount of cadmium incorporated, but the damage was bigger: more lipid peroxidation, reduced amount of free sulfhydryl residues, increased potassium loss, high generation of free radicals and a higher proportion of dead cells by apoptosis. We also observed that cells with a high lipid peroxidation (*ahp1Δ*), did not show a big difference from *BY4741-WT*, but are more sensitive to cadmium in tolerance test. And the strain with a deletion in transports of potassium did not showed significant differences in relation to strain *BY4741-WT*. All our results showed that the absence of trehalose in *S. cerevisiae* favoured the apoptosis in cells, and this process was intensified by the presence of cadmium.

Lista de figuras

Figura 1 - Cadeia respiratória da levedura <i>S. cerevisiae</i> – representando apenas a membrana mitocondrial interna.	1
Figura 2 - Formação das espécies reativas de oxigênio durante as etapas de redução do O ₂	2
Figura 3 - Ativação de vias de sinalização em resposta ao estresse oxidativo.....	5
Figura 4 - Esquema dos principais estágios da peroxidação lipídica	7
Figura 5 - Estruturas dos derivados carbonilados produzidos por meio da oxidação de resíduos de aminoácidos das proteínas.	9
Figura 6 - Genes envolvidos no influxo e efluxo de Cd ²⁺ em <i>S. cerevisiae</i>	19
Figura 7 - Estrutura do complexo Cd(GS) ₂ formado pelo cádmio e duas moléculas de glutationa	20
Figura 8 - Possíveis mecanismos de indução ao estresse oxidativo pelo cádmio.	24
Figura 9 - Estrutura química da α,α1-1 trealose.	25
Figura 10 - Via da síntese de trealose em leveduras.....	26
Figura 11 - Estrutura do brometo de etídio (3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenatridina).	36
Figura 12 - Estrutura da floxina B.	36
Figura 13 - Reagente Ellman	37
Figura 14 - Reação de TBARS entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído, formando o complexo colorido TBA-MDA	38
Figura 15 - Esquema mostrando a oxidação da sonda fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato.	39
Figura 16 – Tolerância das diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> ao CdCl ₂	44
Figura 17 - Análise da integridade da membrana utilizando brometo de etídio nas linhagens <i>BY4741-WT</i> , <i>tps1Δ</i> , <i>ahp1Δ</i> , <i>trk1Δ</i> e <i>trk2Δ</i>	47
Figura 18 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem <i>BY4741-WT</i>	48

Figura 19 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem <i>tps1Δ</i>	49
Figura 20 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem <i>ahp1Δ</i>	50
Figura 21 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem <i>trk1Δ</i>	51
Figura 22 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem <i>trk2Δ</i>	52
Figura 23 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B nas linhagens <i>BY4741-WT</i> , <i>tps1Δ</i> , <i>ahp1Δ</i> , <i>trk1Δ</i> e <i>trk2Δ</i>	54
Figura 24 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem <i>BY4741-WT</i>	55
Figura 25 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem <i>tps1Δ</i>	56
Figura 26 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem <i>ahp1Δ</i>	57
Figura 27 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem <i>trk1Δ</i>	58
Figura 28 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem <i>trk2Δ</i>	59
Figura 29 - Determinação da quantidade de lipídeos peroxidados após 24 horas de incubação com CdCl ₂ em linhagens <i>S. cerevisiae</i>	74
Figura 30 - Determinação da quantidade de resíduos sulfidrílicos totais após 24 horas de incubação com CdCl ₂ em linhagens <i>S. cerevisiae</i>	78
Figura 31 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae BY4741-WT</i>	81
Figura 32 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae tps1Δ</i>	82
Figura 33 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae ahp1Δ</i>	83
Figura 34 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae trk1Δ</i>	84
Figura 35 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae trk2Δ</i>	85

Figura 36 - Avaliação das alterações nucleares via coloração com DAPI - Linhagem <i>BY4741-WT</i>	88
Figura 37 - Avaliação das alterações nucleares via coloração com DAPI - Linhagem <i>tps1Δ</i>	89
Figura 38 - Análise das alterações nucleares por meio da coloração com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio na linhagem <i>BY4741-WT</i>	92
Figura 39 - Análise das alterações nucleares por meio da coloração com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio na linhagem <i>tps1Δ</i>	93

Lista de tabela

Tabela 1 - Morte celular, caspase-dependente e caspase-independente, em leveduras.	14
Tabela 2 - Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas	31
Tabela 3 - Incorporação de cádmio após 24 horas por diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	63
Tabela 4 - Determinação de potássio em diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	67
Tabela 5 - Velocidade de incorporação ¹⁰⁹ Cd (cpm/hora/ 2 x 10 ⁸ cel/mL) nas linhagens <i>S. cerevisiae</i> <i>BY4741-WT</i> e <i>S. cerevisiae tps1Δ</i>	70
Tabela 6 - Porcentagem de células coradas com DAPI na linhagem <i>BY4741-WT</i>	88
Tabela 7 - Porcentagem de células coradas com DAPI na linhagem <i>tps1Δ</i>	89
Tabela 8 - Porcentagem de células coradas com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio na linhagem <i>BY4741-WT</i>	92
Tabela 9 - Porcentagem de células coradas com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio na linhagem <i>tps1Δ</i>	93

Lista de Abreviaturas

µg	Unidade de medida micrograma
µL	Unidade de medida microlitro
mL	Unidade de medida mililitro
mg	Unidade de medida miligrama
nm	Nanômetro
AIF	Do inglês “ <i>Apoptotic Inducing Factor</i> ” traduzido como fator indutor de apoptose
Al	Alumínio
<i>ahp1</i>	Células deficientes no gene que codifica a enzima alkil hidroperóxido redutase 1
ASTDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
BSA	Soro albumina bovina
BE	Brometo de Etídio
BER	<i>Base excision repair</i>
Cd²⁺	Cádmio
CdCl₂	Cloreto de cádmio
Cd(GS)₂	Complexo bis (glutacionato) de cádmio
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CO	Grupo carbonil
cpm	Contagem por minuto
Cu²⁺	Cobre
Cys	Cisteína
DAPI	4´6-diamidino-2-phenyllindole, dihydrochloride
DCH	Diclorofluoresceína
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DHR-123	Dihidrorodamina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNP	2,4 Dinitrofenilhidrazona
DNPH	2,4 Dinitrofenilhidrazina
D.O.	Densidade óptica

DTNB	5'5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico
EDTA	do inglês "Ethylenediamine-tetra acetic acid" traduzido como Ácido etilenodiamino tetra acético
ERK	Kinase regulada por sinais oxidativos extracelulares
GSH	Glutationa reduzida
GSH1	Gene da enzima responsável pela síntese da glutatona
GSH2	Gene da enzima responsável pela síntese da glutatona
GSSG	Glutationa oxidada
H₂O	Molécula da água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
His	Histidina
Hg	Mercúrio
HNE	4 hidroxi-2-noneal
INARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
JNK	cinase c-jun amino-terminal
K⁺	íon Potássio
LA	do inglês "Acridine Orange" traduzido como Laranja de Acridina
LH	Lipídeo
LOOH	Hidróxido Lipídico
Lys	Lisina
MAPK	do inglês "Mitogen-Activated Protein Kinase" traduzido como proteína cinase ativada por mitógeno
MCP	Morte Celular Programada
MDA	Malondialdeído
MMR	Reparo de erros de emparelhamento
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MT	Metalotioneína
Na⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
Pb	Chumbo
PBS	Tampão Fosfato Salino
PMSF	Do inglês "Phenylmethysulphonyl fluoride"
PNR	Produtos não radicais

ppm	Partes por milhão
PUFA	Ácidos graxos polinsaturados
O₂	Molécula de Oxigênio
O₂⁻	Ânion superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
<i>ogg1</i>Δ	Células deficiente no gene que codifica glicosilase específica para excisão 8-oxoguanosina
ROO[•]	Radical Peroxil
ROS	Espécies reativas de Oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
r.p.m.	Rotações por minuto
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies que reagem com ácido tiobarbitúrico (<i>thiobarbituric acid reagent species</i>)
TCA	Ácido Triclorácético
<i>trk1</i>Δ	Células deficientes no gene do sistema transportador de potássio
<i>trk2</i>Δ	Células deficientes no gene do sistema transportador de potássio
<i>tps1</i>Δ	Células deficientes no gene que codifica a enzima trealose-6-fosfato sintase
Zn	Zinco
YNB	Meio de cultura contendo base nitrogenada de levedura, “ <i>Yeast Nitrogen Base</i> ”
YPD	Meio de cultura contendo peptona, extrato de levedura e glicose

Sumário

Agradecimentos	VI
Resumo	VIII
Abstract	IX
Lista de figuras	X
Lista de Abreviaturas	XIV
Sumário	XVII
1 - Introdução	1
1.1 - Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo.....	1
1.2 - Danos causados pelos radicais livres	5
1.2.1 - Danos aos lipídeos: Peroxidação de lipídeos	5
1.2.2 - Danos às proteínas: Carbonilação de proteína	7
1.2.3 - Danos ao DNA	9
1.3 - Apoptose	10
1.3.1 - Vias apoptóticas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.4 - Metais essenciais e não essenciais: considerações gerais.....	15
1.5.1 - Mecanismo de toxicidade do cádmio em <i>S. cerevisiae</i>	18
1.5.2 - Cádmio, estresse oxidativo e apoptose em <i>S. cerevisiae</i>	21
1.6 - Trealose.....	25
2 - Justificativa	28
3 - Objetivos	30
3.1 - Objetivo Geral	30
3.2 - Objetivos Específicos	30
4 - Materiais e Métodos	31
4.1 - Linhagens de estudo	31
4.2 - Meios de cultura	32
4.3 - Estresse com cloreto de cádmio.....	32
4.4 - Determinação da quantidade de cádmio e potássio em <i>S. cerevisiae</i>	33
4.5 - Incorporação de ¹⁰⁹ Cd.....	34
4.6 - Obtenção de extratos celulares	34

4.7 - Dosagem de proteínas.....	34
4.8 - Tolerância ao cádmio.....	35
4.9 - Análise da viabilidade celular.....	35
4.9.1 - Análise da integridade de membrana com Brometo de Etídio.....	35
4.9.2 - Análise da atividade metabólica com uso da Floxina B.....	36
4.10 - Resíduos Sulfidrílicos Totais.....	37
4.11 - Peroxidação de lipídeos.....	37
4.12 - Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio.....	38
4.13 - Avaliação do mecanismo de morte.....	39
4.13.1 - Avaliação das alterações nucleares via coloração com DAPI.....	39
4.13.2 - Avaliação das alterações nucleares por meio da coloração com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio.....	40
4.14 - Descarte de Rejeitos.....	40
4.14.1 - Descarte de rejeito químico.....	40
4.14.2 - Descarte de rejeito radioativo – Cd ¹⁰⁹	41
4.15 - Análise Estatística.....	41
5 - Resultados e Discussão.....	42
5.1 - Tolerância das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> ao cádmio.....	42
5.2 – Avaliação da viabilidade celular após 24 horas de exposição ao CdCl ₂	45
5.2.1 – Avaliação da integridade da membrana com o uso do brometo de etídio ...	45
5.2.2 – Avaliação de células metabolicamente ativas com o uso do corante floxina.....	53
5.3 - Incorporação de cádmio.....	60
5.4 - Determinação do íon potássio após incorporação de cádmio.....	64
5.5 - Determinação da velocidade de captação de ¹⁰⁹ Cd.....	69
5.6 - Determinação da peroxidação de lipídios.....	71
5.7 - Resíduos sulfidrílicos.....	75
5.8 - Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio.....	79
5.9 - Avaliação do mecanismo de morte.....	86
5.7.1 - Avaliação das alterações nucleares através da coloração com DAPI.....	86
5.7.2 - Avaliação das alterações nucleares por meio da coloração com Laranja de Acridina.....	90
6 - Conclusões.....	94
7 – Referências Bibliográficas.....	95

1 - Introdução

1.1 - Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

A molécula de O_2 é a principal receptora biológica de elétrons e desempenha importante papel nas funções celulares, incluindo o processo de respiração aeróbica. Normalmente, em torno de 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos é reduzido por meio da cadeia de transporte de elétrons (HALLIEWELL, 1989). A cadeia de transporte de elétrons, localizada, em sua maior parte, na membrana interna da mitocôndria, consiste em uma série de moléculas arranjadas espacialmente de acordo com seu poder redutor, ou seja, quanto mais afastada do início da cadeia, maior é seu poder de receber elétrons, sendo conseqüentemente reduzidos. O oxigênio é reduzido pelo sistema citocromo c oxidase, fornecendo quatro elétrons provenientes principalmente dos complexos I-IV, que se reduz diretamente à água (FAXÉN, *et al.*, 2005). Assim, as moléculas de oxigênio diatômico (O_2) na atmosfera terrestre são as maiores promotoras de reações redox nas células vivas. Apresentamos na figura 1 a cadeia transportadora de elétrons específica da levedura *S. cerevisiae*, observa-se pequenas diferenças, quando comparadas a cadeia transportadora de elétrons de mamíferos superiores, no complexo 1.

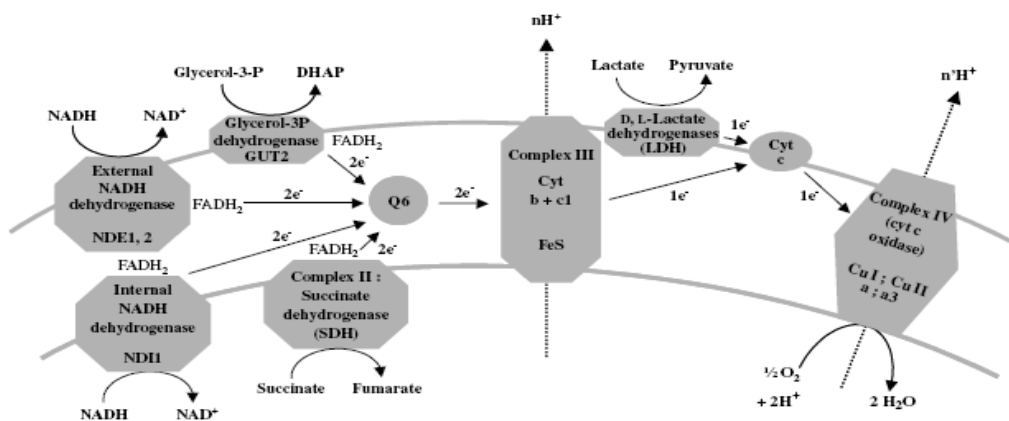


Figura 1 - Cadeia respiratória da levedura *S. cerevisiae* – representando apenas a membrana mitocondrial interna. Fonte: ROSENFELD & BEAUVOIT, 2003.

Do total do oxigênio consumido por uma célula cerca de 0,1% a 4% não chega a ser completamente reduzido até água. Quando a redução do oxigênio ocorre de maneira parcial, existe a formação de espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen*

Species, ou seja, ROS), também conhecidas simplesmente por radicais livres. As ROS incluem o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A diferença das ROS para a molécula de oxigênio é que elas possuem um ou mais elétrons não pareados (Figura 2) (KILEY *et al.*, 2004).

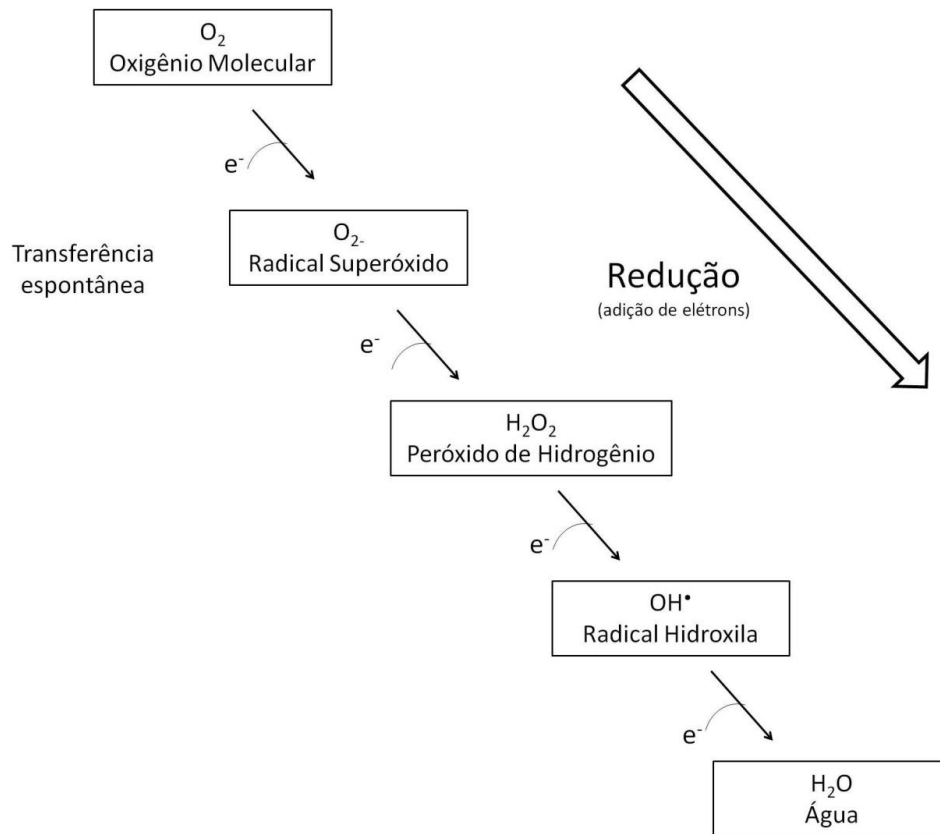


Figura 2 - Formação das espécies reativas de oxigênio durante as etapas de redução do O_2 . O oxigênio molecular pode receber espontaneamente um elétron, gerando o radical ânion superóxido convertendo-se em peróxido de hidrogênio. Este pode ser reduzido a radical hidroxila, ao receber mais um elétron. O radical hidroxila é finalmente reduzido a água quando recebe o quarto elétron - Adaptado de: KILEY *et al.*, 2004.

A levedura *S. cerevisiae* responde à disponibilidade de O_2 pela expressão diferencial de diversos genes, principalmente aqueles que regulam a utilização de fontes de carbono. A eficiência de utilização da fonte de carbono durante o crescimento em presença ou, ausência de O_2 , é usada para a classificação das leveduras (ROSENFELD & BEAUVOIT, 2003) e, a relação entre geração de radicais livres em muitas destas situações não é conhecida.

As leveduras podem ser cultivadas sob 3 diferentes níveis de oxigênio: ausência de oxigênio (anaerobiose), limitação de oxigênio (o crescimento é limitado pela

presença de O₂) e aerobiose (presença de oxigênio não limita o crescimento). Com base no comportamento metabólico as leveduras são classificadas em: aeróbicos estritos (respiração, apenas metabolismo oxidativo ex. *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*) e aeróbicos facultativos (metabolizam glicose via fermentação na presença de O₂). No caso do segundo grupo, dos aeróbicos facultativos, as vias fermentativas e oxidativas podem funcionar conjuntamente. Assim, os aeróbicos facultativos podem ser subdivididos em *Crabtree* negativo (incapazes de fermentar glicose em alta concentração de O₂, mas, produzem etanol sob condições de limitação de O₂ (*Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia*) e *Crabtree* positivo, aqueles que realizam fermentação alcoólica sob condições aeróbicas (*Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*) (ROSENFELD & BEAUVOIT, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2006)

Ao contrário do que se possa racionalmente deduzir, na ausência total de O₂, células crescidas em anaerobiose, apresentam padrões de estresse oxidativo aumentado (maior carbonilação de proteínas e maior quantidade de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina - 8-OH-dG), razão pela qual Dirmeier e colaboradores (2002) concluíram que a anoxia induz ao estresse oxidativo e também a maior expressão de metalotioneínas e GPx (Liu *et al.*, 2005). Por outro lado, células da levedura *S. cerevisiae* usando respiração (fosforilação oxidativa) são mais resistentes à H₂O₂ e anion superóxido (JAMIESON, 1998).

As ROS tais como O₂^{•-}, e OH[•] e H₂O₂, são produzidas em todos os organismos aeróbicos, e normalmente existem na célula em equilíbrio com moléculas antioxidantes. De acordo com esta visão, o estresse oxidativo ocorre quando mecanismos de defesa celulares são incapazes de agir sobre os radicais livres ou seus efeitos deletérios. A formação de ROS pode ser acelerada como consequência de várias condições de estresse do meio, incluindo radiação UV, alta intensidade de luz, exposição a herbicidas, temperaturas extremas, toxinas, poluentes e metais (SCANDALIOS, 2005).

Avanços nos estudos da ação das ROS levaram à concepção de uma nova definição para o estresse oxidativo que considera o papel vital das ROS como moléculas sinalizadoras responsáveis pela modulação de vias de transdução de sinais, do balanço redox e de seus controles (JONES, 2006; SIES & JONES, 2007). Alterações no controle redox e na sinalização podem ocorrer com ou sem mudança no balanço total dos

oxidantes e antioxidantes. Por exemplo: agentes oxidantes como metais, podem romper seletivamente vias de sinalização, e a adição de antioxidantes não mudará este panorama. Dependendo da concentração, alguns antioxidantes podem se tornar um pro-oxidante em total antagonismo à definição antiga de desbalanço entre oxidantes e antioxidantes (HANSEN *et al.*, 2006)

As espécies reativas de oxigênio participam também da comunicação bioquímica das células e organismos (GHEZZI *et al.*, 2005). As ROS atuam em vias de sinalização específicas, tanto na resposta ao estresse, como em processos fisiológicos normais (INOUNE *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2005). Entre as principais vias de sinalização em resposta ao estresse oxidativo estão as ERK (cinase regulada por sinais oxidativos extracelulares), JNK (cinase c-jun amino-terminal) e p38 ativada por MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) e a resposta ao choque térmico. A ativação destas vias não é exclusiva ao estresse oxidativo, elas também participam na regulação das respostas celulares a outros estresses, bem como da regulação do metabolismo e do crescimento normal. Em muitas situações a resposta aos oxidantes pode envolver uma super estimulação das vias de sinalização normais regulada pelas ROS (Figura 3) (FINKEL *et al.*, 2000).

Atualmente é consenso que, assim como ROS são agentes deletérios celulares e geram estresse oxidativo, essas espécies reativas podem atuar também como agentes sinalizadores em células eucarióticas, direcionando o metabolismo para apoptose, proliferação celular ou senescência em resposta a citocinas, fatores de crescimento, danos ao DNA, hipoxia (FINKEL 1998; FRATELLI *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2007.)

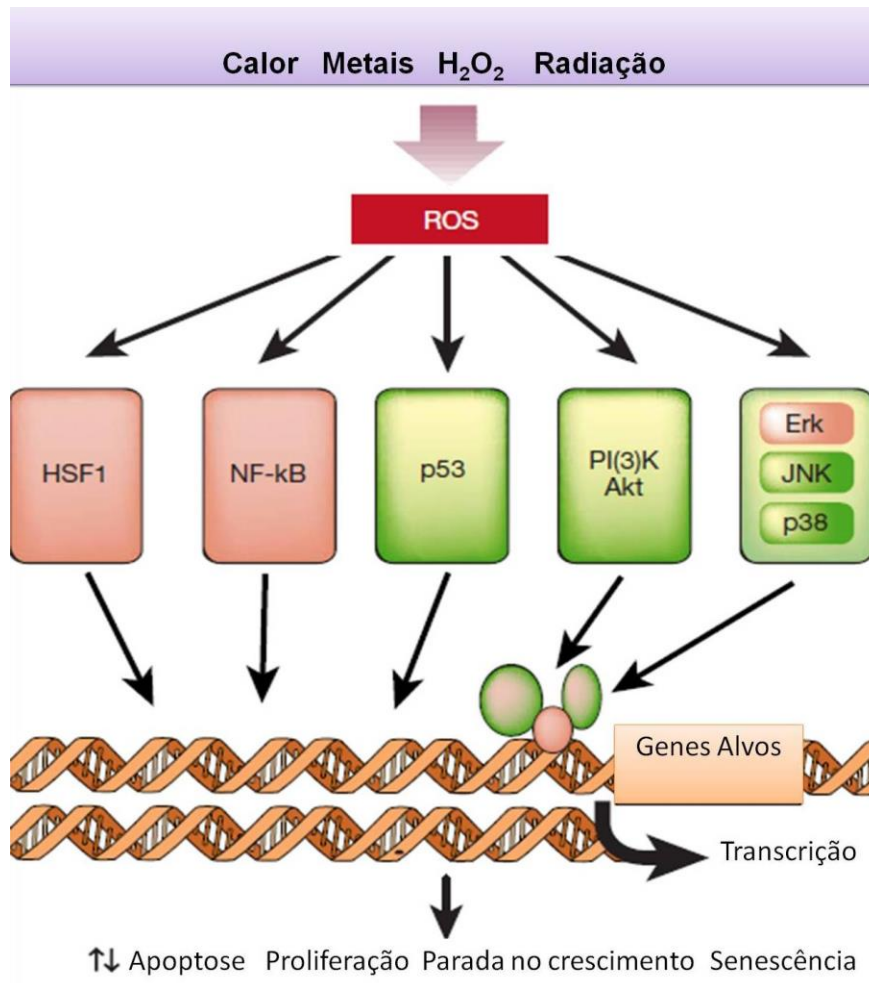


Figura 3 - Ativação de vias de sinalização em resposta ao estresse oxidativo. Adaptado de FINKEL *et al.*, 2000.

1.2 - Danos causados pelos radicais livres

1.2.1 - Danos aos lipídeos: Peroxidação de lipídeos

A reação de radicais livres com lipídeos pode levar à formação de peróxidos lipídicos via um processo conhecido como peroxidação lipídica. O processo de peroxidação de lipídeos é uma reação em cadeia dirigida por um radical livre que pode induzir a oxidação de um grande número de moléculas lipídicas (LH), principalmente fosfolipídeos contendo ácidos graxos polinsaturados (PUFA). Os ácidos graxos monoinsaturados e saturados são menos reativos, mas também podem sofrer oxidação (CATALÁ, 2006).

Geralmente o estresse oxidativo leva à produção de peróxidos lipídicos e, assim, a determinação da extensão da peroxidação dos lipídeos das membranas celulares também é considerada uma forma de monitorar o quadro de estresse oxidativo sofrido pela célula (ESTERBAUER *et al.*, 1991).

A peroxidação de lipídeos ocorre quando um componente pró-oxidante reage com um ácido graxo insaturado da membrana biológica; sua modificação causa mudança nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando assim a fluidez e a permeabilidade com consequente aumento no risco de ruptura da membrana. As modificações no estado redox do lipídeo podem também afetar propriedades específicas da membrana, tais como transdução de sinais e alterações na permeabilidade iônica (VENDEMIALE *et al.*, 1999).

O processo de peroxidação lipídica ocorre em três estágios: o primeiro estágio é a *iniciação*, que envolve o ataque de espécies reativas de oxigênio capazes de arrancar um átomo de hidrogênio de um PUFA. Rapidamente uma molécula de oxigênio adiciona-se a este radical lipídico formando um radical livre centrado no carbono (L^\bullet) levando, posteriormente, à formação de um radical peróxi-lipídico. Este, por sua vez, pode abstrair um átomo de hidrogênio de outra PUFA.

O próximo estágio é chamado de *propagação*, resulta na conversão de vários moléculas de PUFA à lipídeos hidroperóxidos. O hidroperóxido lipídico (LOOH) é o primeiro produto da reação de peroxidação de lipídeo. No último estágio, chamado *terminação*, ocorre a formação de produtos não radicais (PNR). Estes produtos (PNR), conhecidos como produtos secundários, não são inócuos, pelo contrário, são bem reativos e podem atacar outras proteínas, lipídeos e o DNA (Figura 4).

Na presença de metais de transição, o LOOH pode aumentar a geração de radicais capazes de reiniciar a peroxidação de lipídeos pelo ciclo redox de alguns metais. Os hidroperóxidos lipídicos, na ausência ou presença de metais também podem gerar uma grande variedade de produtos, incluindo aldeídos de cadeias curtas e longas (CATALÁ, 2006).

Uma vez formado, o radical peroxil (ROO^\bullet) pode também se rearranjar via reação de ciclização dos endoperóxidos (precursores do malondialdeído) com o produto final do processo de peroxidação, formando o malondialdeído (MDA), que pode causar danos ao reagir com as bases de DNA (MARNETT, 1999). Outro aldeído produzido via o processo de peroxidação de lipídeos é o 4 hidroxil-2-noneal (HNE) que é um mutagênico fraco, mas aparece como o principal produto tóxico da peroxidação de

lipídeos pois se liga aos grupamentos sulfidrílicos ou amina das proteínas. (VALKO *et al.*, 2006).

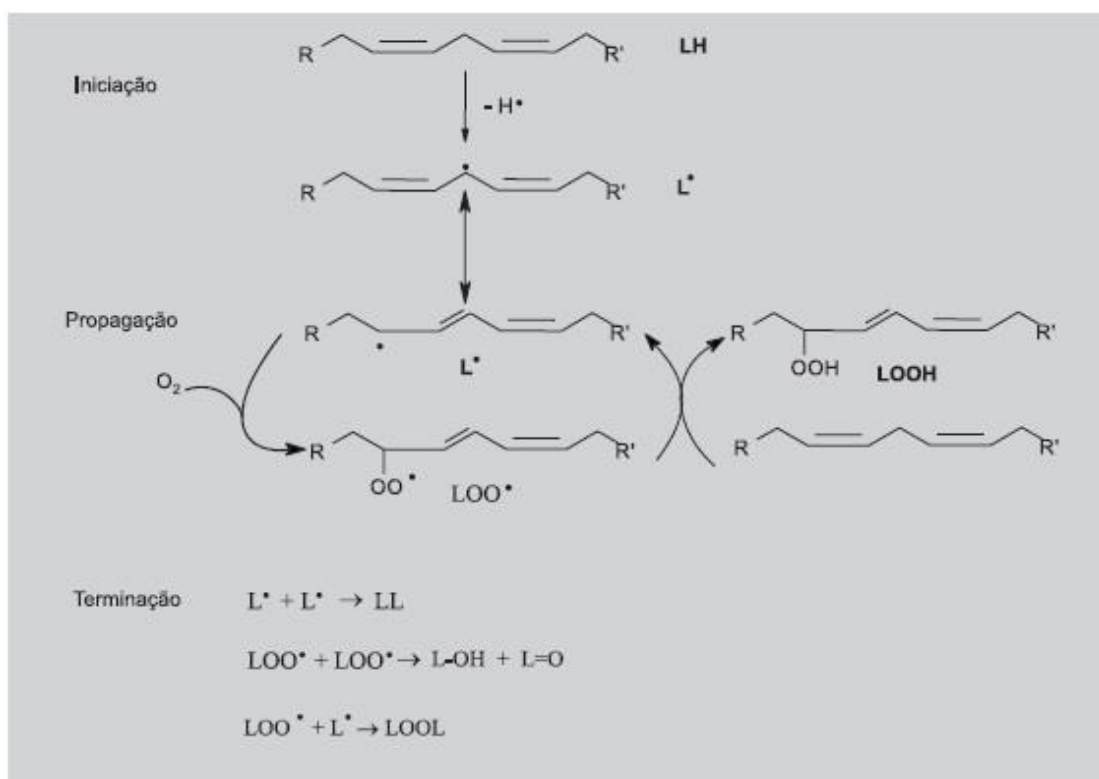


Figura 4 - Esquema dos principais estágios da peroxidação lipídica (LIMA & ABDALLA; 2001).

1.2.2 - Danos às proteínas: Carbonilação de proteína

A oxidação de proteínas pode ser induzida pela oxidação direta dos aminoácidos pelas ROS ou por meio dos subprodutos gerados pelo estresse oxidativo, como por exemplo, carboidratos e lipídeos modificados pelo estresse oxidativo. (CHAKRAVARTI *et al.*, 2007). As ROS podem causar graves e irreversíveis danos às biomoléculas, sendo as proteínas um dos principais alvos dos danos oxidativos (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

As alterações das proteínas iniciam-se basicamente pelo radical OH•, porém a continuidade deste processo de oxidação é dependente da disponibilidade de oxigênio. Coletivamente, as ROS conduzem à oxidação de resíduos de aminoácidos, o que pode resultar na fragmentação das proteínas (BERLETT & STADTMAN, 1997). Os danos

causados pelos radicais superóxido são específicos aos grupamentos 4Fe-4S, gerando assim o aumento da liberação de ferro e a inativação das proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). No caso do peróxido de hidrogênio, a inativação das enzimas ocorre devido a oxidação de grupamentos tióis em resíduos cisteínas presentes nos sítios ativos, levando á formação de ligações dissulfeto (S-S) (LEE *et al.*, 1999).

O aumento de proteínas carboniladas em resposta ao estresse oxidativo não ocorre ao acaso, muitas proteínas são mais susceptíveis a carbonilação do que outras (DALLE-DONNE *et al.*, 2006). Segundo Standman & Levine (2000, 2003), a presença de metais de transição nestas proteínas são a chave para uma maior susceptibilidade e, portanto, podem sofrer maior carbonilação via oxidação catalisada por metais. Os metais de transição em proteínas são fontes de radicais livres que iniciam a cascata de reações resultando na adição de grupos carbonilas aos resíduos de aminoácidos da cadeia protéica. Acredita-se ainda que muitas proteínas como, por exemplo, enzimas que atuam no ciclo de Krebs e na cadeia de transporte de elétrons, podem também ser susceptíveis à oxidação principalmente por estarem localizadas na mitocôndria, um dos principais sítios geradores de espécies reativas de oxigênio (NYSTRÖM, 2005).

A oxidação por radicais livres de vários aminoácidos resulta na formação de grupos carbonilas nas proteínas (STADTMAN & LEVINE, 2000). Grupos carbonilas (aldeídos e cetonas) são gerados pela oxidação dos grupamentos laterais, principalmente os resíduos prolina, arginina, lisina e treonina. Na figura 5 está representado o resultado final da carbonilação em quatro aminoácidos, observa-se que esta reação altera o aminoácido original, fato que pode comprometer toda a estrutura protéica (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

Os grupos carbonilas podem também ser introduzidos nas proteínas por meio de reações dos resíduos Cys, His e Lys, com produtos da peroxidação de lipídeos (4-hidroxi-2-noneal, malondialdeído), com a reação de redução de açúcares ou, ainda, os produtos da redução de açúcares podem se ligar aos resíduos de lisina das proteínas (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

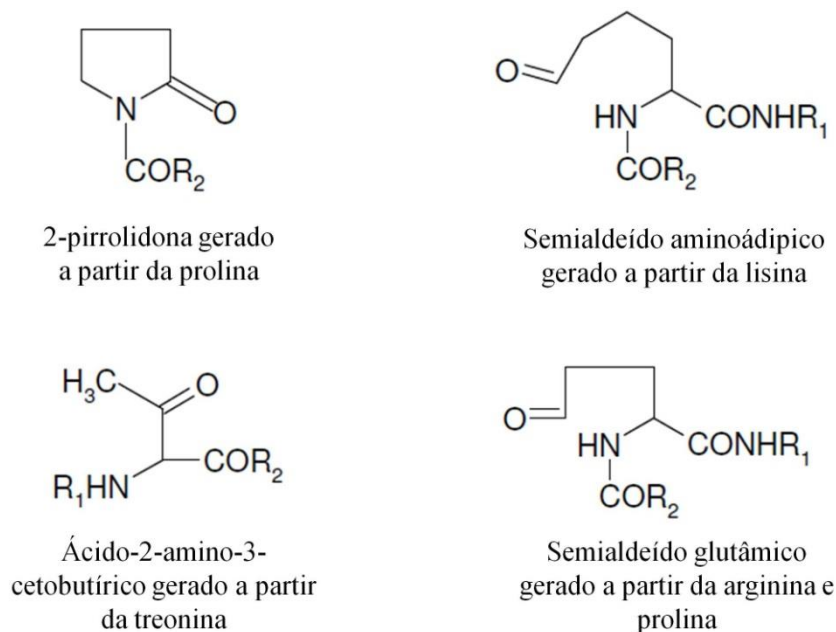


Figura 5 - Estruturas dos derivados carbonilados produzidos por meio da oxidação de resíduos de aminoácidos das proteínas. Adaptado: DALLE-DONE *et al.*, 2003.

Os grupos carbonilas são utilizados como um indicador da intensidade dos ataques dos radicais livres nas proteínas (STADTMAN & LEVINE, 2000). Existem vários métodos de dosagens das quantidades de proteínas carboniladas, todos são baseados na interação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, resultando na formação da dinitrofenilhidrazona (DNP), sendo muito utilizada a metodologia espectrofotométrica e reconhecimento do anticorpo (LUSHCHAK, 2006).

1.2.3 - Danos ao DNA

A integridade do genoma é essencial para a manutenção das funções celulares corretas, principalmente para replicação, expressão gênica e síntese protéica. A indução de danos ao DNA pode gerar uma parada no ciclo celular, mutagênese, instabilidade genômica, câncer e também morte celular programada (apoptose).

A exposição das células às ROS resulta em diversas lesões na molécula de DNA, causando danos como modificação de base do DNA, quebra de uma única fita ou ambas, perda de purinas, ligação DNA-proteína, dano no açúcar desoxirribose e dano nos sistemas de reparo (COSTA *et al.*, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Dentre os danos oxidativos mais perigosos, as alterações nas bases nitrogenadas possuem uma posição de destaque, pois são frequentemente associadas à formação de mutações e à perda da integridade do DNA. Outro dano oxidativo frequentemente encontrado em DNA é a formação de sítios abásicos (sítios com perda de bases nitrogenadas) que podem levar à quebra de fitas simples. Diferentes estudos relacionam a perda da integridade genômica de células humanas com o processo de envelhecimento, doenças degenerativas e câncer (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007).

O dano ao DNA mais frequente induzido pelas ROS é a formação de 7,8-dihidro-8-oxo-guanina (8-oxo-G), que se trata de um importante marcador de estresse oxidativo. O baixo potencial redox da guanina (G) faz com que esta base nitrogenada seja mais vulnerável ao ataque de ROS (LOON *et al.*, 2010). O acúmulo dessa base danificada está relacionado com o aumento de mutagênese espontânea (FRAGA *et al.*, 1990).

Em *S. cerevisiae*, o peróxido de hidrogênio e superóxidos geram compostos que induzem a oxidação das bases, produzindo quebra das fitas simples e o aumento da frequência de recombinação intracromossomal (FRANKENBERG *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1998). As células possuem mecanismos capazes de remover e substituir as bases oxidadas por meio de um sistema secundário de defesa antioxidante (COSTA, *et al.*, 2001).

O reparo dos danos de DNA é interligado com a regulação do ciclo celular, transcrição e replicação. Quando os danos superam a capacidade de reparo das células, esses mecanismos celulares podem ser totalmente afetados. Assim, caso essas lesões não sejam removidas, podem levar as células à morte ou resultarem na incorporação de mutações no genoma, sendo transmitida para futuras gerações (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007).

1.3 - Apoptose

A morte celular programada (MCP) pode ser definida como um processo ativo, que é caracterizado por um ciclo de eventos moleculares endógenos, que representam uma forma de “suicídio celular”, onde a célula apresenta um papel ativo em sua morte

(Leist *et al.*, 2001). O processo de morte celular é um dos principais mecanismos de controle do número de células (diferenciação, embriogênese, envelhecimento e metamorfose), agindo também no mecanismo de defesa removendo células indesejadas e até mesmo potencialmente perigosas para o organismo e na prevenção de diversas doenças, incluindo cardiomiopatia e cânceres (Mignotte *et al.*, 1998).

Os primeiros estudos sobre morte celular programada foram realizados por Kerr e colaboradores (1972a) que realizaram experimentos ultra estruturais clássicos que forneceram evidências de que as células sofrem ao menos dois tipos distintos de morte celular. O primeiro tipo conhecido é a necrose, uma forma violenta e rápida de degeneração celular que afeta populações extensas, caracterizadas por aumento do volume citoplasmático, destruição de organelas e rompimento da membrana plasmática, levando à liberação de conteúdo intracelular e inflamação. O segundo tipo de morte celular é a programada, também é conhecida como apoptose. Identificado em células isoladas e geralmente cercado por células aparentemente saudáveis, é caracterizado por retração das células, formação de “bolhas” na membrana plasmática, manutenção da integridade das organelas e condensação e fragmentação do DNA, seguida de remoção por fagocitose (KERR *et al.*, 1972b; WYLLIE *et al.*, 1981). Durante os últimos 30 anos, as pesquisas consideravam apoptose e necrose como um único acontecimento. No entanto, evidências indicam que além de apoptose existem outras formas de mortes celulares, como morte celular autofágica, necrose programada, colapso mitocondrial, entre outras. (KROEMER *et al.*, 2009).

O termo apoptose deriva do grego *apó* = separação, *ptôsis* = queda, e significa cair ou se desprender (KERR *et al.*, 1972a). As células que sofrem morte celular por apoptose apresentam características morfológicas e bioquímicas específicas, que incluem exposição da fosfatidilserina da parte interna para a parte externa da membrana (MARTIN *et al.*, 1995), condensação de cromatina, fragmentação do DNA genômico e a divisão do citoplasma e do núcleo em corpos apoptóticos ligados à membrana, contendo ribossomas, mitocôndrias intactas e material nuclear (GROSS *et al.*, 1999).

Múltiplos fatores regulam este mecanismo que pode ser desencadeado por estímulos intra e extracelulares que ocasionam danos nos processos de reparo do DNA ou se ligam a receptores na superfície celular (GEWIES, 2003). Para que o mecanismo apoptótico ocorra, há uma família de endonucleases intracelulares denominadas caspases que são cisteínas proteases descobertas a partir de estudos genéticos no

nematóidio chamado *Caenorhabditis elegans* (HENGARTNER, 1999; HENGARTNER, 2001; GEWIES, 2003).

1.3.1 - Vias apoptóticas em *Saccharomyces cerevisiae*

Por muitos anos, acreditou-se que o processo de apoptose ocorria apenas em organismos multicelulares. No entanto, Madeo e colaboradores descreveram em 1997 a ocorrência de apoptose em linhagens de *S. cerevisiae* com mutação no gene CDC48 (que codifica uma proteína associada à degradação de retículo endoplasmático em vesículas). Os autores observaram que a ausência desse gene resultou em apoptose com características idênticas a de células de mamíferos, tais como exposição da fosfatidilserina, fragmentação de DNA e condensação de cromatina.

Após esta descoberta, diferentes deleções de genes (FRÖHLICH *et al.*, 2007) e vários compostos exógenos foram analisados como indutores de apoptose em leveduras, tais como: peróxido de hidrogênio (MADEO *et al.*, 1999), ácido acético (LUDOVICO *et al.*, 2001; LUDOVICO *et al.*, 2002), aspirina (BALZAN *et al.*, 2004), NaCl (HUN *et al.*, 2002); açúcares (GRANOT *et al.*, 2003), ácido fórmico (DU *et al.*, 2008), hipoclorito (KING *et al.*, 2004) e arsênio (DU *et al.*, 2007). Além destes compostos químicos a apoptose pode ser desencadeada pelo esgotamento de fonte de carbono e energia no meio (HERKER *et al.*, 2004), ausência de aminoácidos essenciais, como lisina e histidina em células auxotróficas (EISLER *et al.*, 2004), danos ao DNA (BURHANS *et al.*, 2003) e deleção de alguns genes, como: SRO7/SOP1 homólogo de um gene que codifica para um supressor de tumor (WADSKOG *et al.*, 2004), deleção ou alteração de genes que codificam para proteína envolvidas na estabilização do mRNA (MAZZONI *et al.*, 2003).

Além de fontes exógenas, a apoptose em leveduras também pode ocorrer por meio de cenários complexos de apoptose, tais como fragmentação mitocondrial (FANNJIANG *et al.*, 2004), liberação de citocromo c (LUDOVICO *et al.*, 2002) e perturbações no citoesqueleto (GOURLAY *et al.*, 2005).

Após a descoberta de que vários fatores exógenos participam no processo de apoptose, era necessário compreender o mecanismo envolvido na morte celular programada em *S. cerevisiae*. Inicialmente, acreditava-se que a morte celular

programada em leveduras estava associada à produção de ROS, e que os radicais eram os únicos reguladores da morte celular por apoptose. Porém esta suposição foi alvo de controvérsia, já que *S. cerevisiae* acumula ROS em quase todos os cenários de apoptose, mas acredita-se que as ROS desempenham um papel secundário, atuando como mensageiro ou regulador do processo (LUDOVICO *et al.*, 2005). O grande passo para se entender o mecanismo de ocorrência de apoptose em leveduras veio com a descrição de um membro da família das “*caspase-like protease*” (YCA1) chamada metacaspase, que é semelhante às caspases dos mamíferos (MADEO *et al.*, 2002) e que desempenha um papel central na apoptose em leveduras (via caspase-dependente) (MADEO *et al.*, 2009; MAZZONI & FALCONE *et al.*, 2008).

De acordo com Madeo e colaboradores (2009) cerca de 40% dos estudos sobre apoptose em levedura são caspase-dependentes. A tabela 1 apresenta os trabalhos realizados em que a supressão do gene YCA1 (metacaspase) foi bem sucedida na proteção das células quando expostas a diferentes fatores.

Madeo e colaboradores (2002) mostraram que a super expressão de *Ycal* resultou em um processo catalítico e que as células eram mais sensíveis a fatores exógenos e estresse oxidativo. Existem diversas vias de apoptose caspase-dependente. Estudos mostram a existência de um fator indutor de apoptose, AIF (*Apoptotic Inducing Factor*), homólogo ao de mamíferos (WISSING *et al.*, 2004). Este fator é encontrado na mitocôndria e, em resposta a estímulos apoptóticos, é translocado para o núcleo, sendo seu modo de atuação em leveduras similar ao observado em mamíferos (LIANG *et al.*, 2008; MADEO *et al.*, 2009). É importante ressaltar também o papel da mitocôndria na apoptose em leveduras. Além da formação de ROS e liberação de reguladores apoptóticos (como por exemplo, *Aifp1* e *CicC*), aparentemente a proliferação mitocondrial é relevante na morte de células via caspase-dependente (FANNJIANG *et al.*, 2004).

Cenários de apoptose Yca1p-dependente		Cenários de apoptose Yca1p-independente	
Estímulos externos	Referências	Estímulos externos	Referências
H ₂ O ₂	[Madeo et al., 2002]	Ácido fórmico	[Du et al., 2008]
Ácido Acético	[Khan et al., 2005] [Ahn et al., 2006] [Guaragnella et al., 2006]	Cobre	[Liang et al., 2007] [Morton et al., 2007]
NaCl stress hiperosmótico	[Mazzoni et al., 2005] [Silva et al., 2005]	Dermaespsinas	[Cheng et al., 2003]
Ácido valérico	[Wadzlog et al., 2004]	Estingolipídios	
Arsénio	[Mitsu et al., 2005]		
Manganês	[Du et al., 2007]		
Cádmio	[Liang et al., 2007] [Nargund et al., 2008]		
Cenários fisiológicos		Cenários fisiológicos	
Envelhecimento cronológico	[Heiter et al., 2004]	Envelhecimento replicativo	[Madeo et al., 2009]
Toxinas virais Auller	[Reiter et al., 2005] [Ivanovska et al., 2005]	Diferenciação em colônias	[Vachová et al., 2005]
Mutações	Processos biológicos	Mutações Sobreexpressão	Processos biológicos
Δ ubp10	Desubstituição	<i>wtp1-1</i>	N-glicosilação
<i>orc2-1</i>	Replicação (DNA)	<i>ost2-3</i>	N-glicosilação
<i>ism4.1</i> (envelhecimento)	Desnívelamento de mRNA	Δ sr077 (NaCl)	Exocitose
Δ fst1	Fissão mitocondrial	NUC1 ^{ms} (EndoG de leveduras)	
Δ ott1 (calor, envelhecimento)	Metabolismo mitocondrial	AIF1 ^{ms} (AIF de leveduras)	
Δ sc1 (H ₂ O ₂ , envelhecimento)	Metabolismo mitocondrial/homeostase	Bax, Bid, caspases humanas	
			[Hauptmann et al., 2006, 2008] [Hauptmann et al., 2006] [Wadzlog et al., 2004] [Büttner et al., 2007] [Wissing et al., 2004] [Lisa-Santamaria et al., 2009] [Guscevi et al., 2005]

Tabela 1 - Morte celular, caspase-dependente e caspase-independente, em leveduras. Adaptado de Madeo *et al.*, 2009.

Como descrito anteriormente e apresentado na tabela 1, nem todos os mecanismos de apoptose em levedura são dependentes da metacaspase YCA1, da mesma forma do encontrado em células de mamíferos que podem sofrer apoptose

caspase-independente. Podemos citar como exemplo, processos apoptóticos induzidos por defeitos na N-glicosilação em células e estresse com Cu²⁺ (LIANG *et al.*, 2007; HAUPTMANN *et al.*, 2008). Nestes dois casos, observaram-se marcadores típicos de apoptose, tais como, fragmentação de DNA, acúmulo de ROS e exposição da fosfatidilserina. Existe ainda outro fator de morte celular caspase independente, o fator Nuc1 codificado pelo gene NUC1, ortólogo da endonuclease G (AndoG) de mamíferos (BÜTTNER *et al.*, 2007). Em leveduras, o Nuc1p se encontra na mitocôndria e após sofrer apoptose é translocado para o núcleo (LI *et al.*, 2001).

Estes trabalhos confirmam que as células de levedura apresentam a capacidade de sofrer apoptose metacaspase-independente. Porém, para que ocorra a morte celular, outras proteases são necessárias. Hecker e colaboradores (2004) demonstraram que durante o envelhecimento cronológico, ocorre o cenário de morte por apoptose em células ausentes de YCA1 e também em células *wild-type*. Por outro lado, Vachová e colaboradores (2005) mostram que para colônias envelhecidas, a deleção de gene YCA1 não resultou em alterações na apoptose, e foi observada atividade de outra protease, demonstrando que outras metacaspases podem estar envolvidas na morte apoptótica de leveduras. Em conjunto, estes dados indicam que, em paralelo com uma via metacaspase-dependente, existe uma rota alternativa de metacaspase-independente.

1.4 - Metais essenciais e não essenciais: considerações gerais

O termo metal pesado vem sendo aplicado a um grupo heterogêneo de elementos incluindo metais, semi-metais e não metais que possuem número atômico maior que 20, ou peso específico maior que 5 g/cm³. Alguns deles são nutrientes essenciais aos organismos, como o Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e Se. São também conhecidos como elementos traços ou metais traços, por serem encontrados em concentrações de poucas partes por milhão. Outros metais são considerados não essenciais ou não apresentam funções fisiológicas, tais como Cd, Al, Hg e Pb (WILLIAMS, 1997).

Metais essenciais são aqueles importantes na manutenção da fisiologia correta da célula e, normalmente, são parte dos sítios ativos de enzimas, co-fatores, etc. A alteração da concentração de metal, mesmo que ele seja um metal essencial, pode ser muito grave e causadora, por exemplo, de patologias em humanos. Caso típico é o ferro,

metal essencial que, em concentrações acima das normais, desencadeia a doença hemocromatose e, e baixas concentrações é responsável pela anemia. Este exemplo evidencia a importância da manutenção da homeostase dos metais.

Os metais podem ainda serem classificados como metais redox ativos ou inativos. Esta classificação baseia-se no fato que alguns metais apresentam reações de oxidação-redução, e estas reações possibilitam a transferência de elétrons entre metais e substratos, como é tipicamente o caso do ferro e cobre. O outro grupo é o dos metais redox inativos ou redox inertes cuja rota primária de toxicidade é a ligação a grupos sulfidrílicos em proteínas, o que levará à depleção de glutatona reduzida, metalotioneínas e alterações em outras proteínas.

Metais possuem importante papel em grande variedade de processos biológicos. Decorrência direta desta importância é a regulação fina e estrita dos processos de captação, estocagem e secreção dos metais, fato que permite a manutenção da concentração dos mesmos em limites que comportam muito poucas flutuações. A ruptura deste equilíbrio dinâmico da homeostase de metais pode acarretar sua ligação em proteínas e/ou deslocamento e ocupação de outros sítios naturais de ligação. Como consequência, os metais podem interagir com DNA, proteínas e lipídeos, causando modificações oxidativas nocivas e, assim, tornam-se tóxicos às macromoléculas biológicas, e este fenômeno está relacionado a diversas patologias, como doenças renais, mal de Parkinson e Alzheimer, diabetes dentre outras. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; STOHS & BAGCHI, 1995; VALKO *et al.*, 2005)

1.5 - Cádmio

De todos os metais poluentes, o cádmio, juntamente com o arsênio e o mercúrio, é um dos mais tóxicos para os seres humanos, animais e plantas (KEFALA *et al.*, 1998). O Cd^{2+} é um dos elementos químicos que compõe a crosta terrestre, estando disseminado nos solos, água e atmosfera do planeta por meio de fenômenos naturais ou pela atividade antropogênica (WHO, 2003). O cádmio é um metal do grupo IIB na tabela periódica e não apresenta qualquer função fisiológica no organismo biológico (LANE *et al.*, 2005).

O cádmio é o elemento número 48 da tabela periódica, com um peso atômico de 112,4. É medianamente denso ($8,6 \text{ g cm}^{-3}$), branco prateado, sendo um metal maleável com ponto de fusão de $320,9^\circ\text{C}$ e de ebulição de 765°C . A concentração de cádmio na crosta terrestre varia entre 0,15 e 0,20 mg kg^{-1} , sendo o 67º metal em abundância (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994). Em 2007, este metal foi o 7º classificado na lista de “Substâncias Perigosas” da ATSDR e Environmental Protection Agency (EPA), onde as substâncias são classificadas conforme a possível exposição humana e sua potencial ameaça à saúde em razão de sua toxicidade (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY, 2008).

Do total do cádmio mundialmente produzido, cerca de 75% é usado na fabricação de baterias, especialmente aquelas de níquel-cádmio. Também é usado na galvanoplastia (revestimento), como pigmentos, em algumas ligas metálicas, fundição de zinco e atividades de solda (BORJESSON *et al.*, 1997; JÄRUP *et al.*, 1998; JÄRUP, 2002). Entretanto, uma grande fonte de exposição ambiental é a emissão de cádmio por fábricas como produto da fundição de zinco (JÄRUP, 2002).

O cádmio é introduzido nos solos principalmente por meio do uso de fertilizantes e mineração de zinco. Na exposição ocupacional, a contaminação ao cádmio ocorre principalmente por meio das vias respiratórias e em menor grau na via gastrointestinal, pela da ingestão. Ambientalmente, a maior fonte de exposição ao cádmio está no tabaco utilizado em cigarros, seguida da ingestão deste metal presente em alimentos. Como resultado do fenômeno de bioacumulação, as quantidades subtóxicas presentes no meio ambiente podem atingir níveis de risco nos elos finais da cadeia trófica (VOLESKY, 1990).

O cádmio tem meia-vida biológica de aproximadamente dez anos, o que o torna essencialmente um metal acumulativo, e não há tratamentos efetivos comprovados contra intoxicação crônica ocasionada por este metal (WAALKES, 2000; JÄRUP, 2002). A porcentagem de absorção de cádmio nos pulmões é de 10 a 50%. Quando introduzido no organismo humano via oral, o cádmio é pouco absorvido, sendo que 95% é eliminado, e o restante é acumulado nos rins e fígado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1989 e 1992).

O cádmio é um potente carcinogênico humano, sua exposição ocupacional tem sido associada com câncer de pulmão, próstata, pâncreas e rins. Devido a sua

característica como um carcinogênico de pulmão (WAISBERG *et al.*, 2005), é classificado na categoria carcinogênico 1 (carcinogênese humana) pelo *International Agency for Research on Cancer* (INARC) (American Cancer Society, 2007).

O mecanismo - ou mecanismos - de carcinogênese do cádmio não são bem conhecidos. Vários modelos celulares têm sido desenvolvidos para definir o potencial carcinogênico deste metal. O cádmio não é um metal redox ativo, ou seja, não age diretamente reduzindo ou oxidando via reação de fenton. O cádmio pode gerar estresse oxidativo de forma indireta. Normalmente o cádmio é imobilizado via ligação a resíduos sulfidrílicos, fato que acarreta a diminuição da resposta antioxidante. Dessa forma o cádmio produz estresse oxidativo de forma indireta que pode resultar em danos às proteínas, DNA e lipídeos. Assim, são fatores que contribuem para a oncogenicidade do cádmio: ativação de genes aberrantes, repressão da apoptose e/ou alteração dos reparos de DNA (WAALKES, 2003).

1.5.1 - Mecanismo de toxicidade do cádmio em *S. cerevisiae*

O cádmio não é um metal essencial para os organismos biológicos, assim, sua entrada nas células é realizada pelo mecanismo conhecido como mimetismo químico (BALLATORI, 2002; BRIDGES & ZALUPS, 2005). Este mecanismo envolve a assimilação de elementos químicos não essenciais por similaridade química com elementos essenciais. Metais não essenciais (por exemplo, cádmio, mercúrio, chumbo, entre outros), são transportados por este mecanismo. Normalmente, estes elementos são transportados para o interior da célula graças a sua semelhança química com elementos essenciais. Por semelhança química, entende-se a configuração espacial, raio iônico e número de oxidação entre outros (BRZÓSKA & MONIUSZKO-JAKONIUK, 2001; MARTELLI *et al.*, 2006). A rota bioquímica para a entrada do cádmio inicia-se pelo transporte deste por transportadores essenciais localizados na membrana celular. O cádmio pode competir com elementos essenciais, tais como Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} , por meio de seus respectivos transportadores presentes na membrana, gerando, assim, alterações nos níveis normais de captação destes metais (HIMENO *et al.*, 2002; GOMES, *et al.*, 2002; BRESSLER *et al.*, 2004) (Figura 6).

Na membrana plasmática de *S. cerevisiae* foram identificados 3 transportadores de membrana associados à captação de Cd^{2+} : Smf1p, Zrt1p e Fet4p. O gene SMF1 que codifica uma proteína de membrana inicialmente descrita como transportador de alta afinidade para Mn^{2+} , mas que também contribui para o transporte de outros metais como cádmio, cobalto, cobre (LIU *et al.*, 1997, REDDI *et al.*, 2009). O transportador Zrt1 é responsável pelo influxo de alta afinidade do Zn^{2+} (MacDiarmid *et al.*, 2000). Em estudos realizados por Gomes e colaboradores (2002) mutantes para o gene ZRT1 possuem alta tolerância à cádmio. A captação de cádmio também pode ser mediada pela proteína Fet4, que se caracteriza como um importador de ferro de baixa afinidade (DIZ *et al.*, 1994; JENSEN & CULLOTA, 2002).

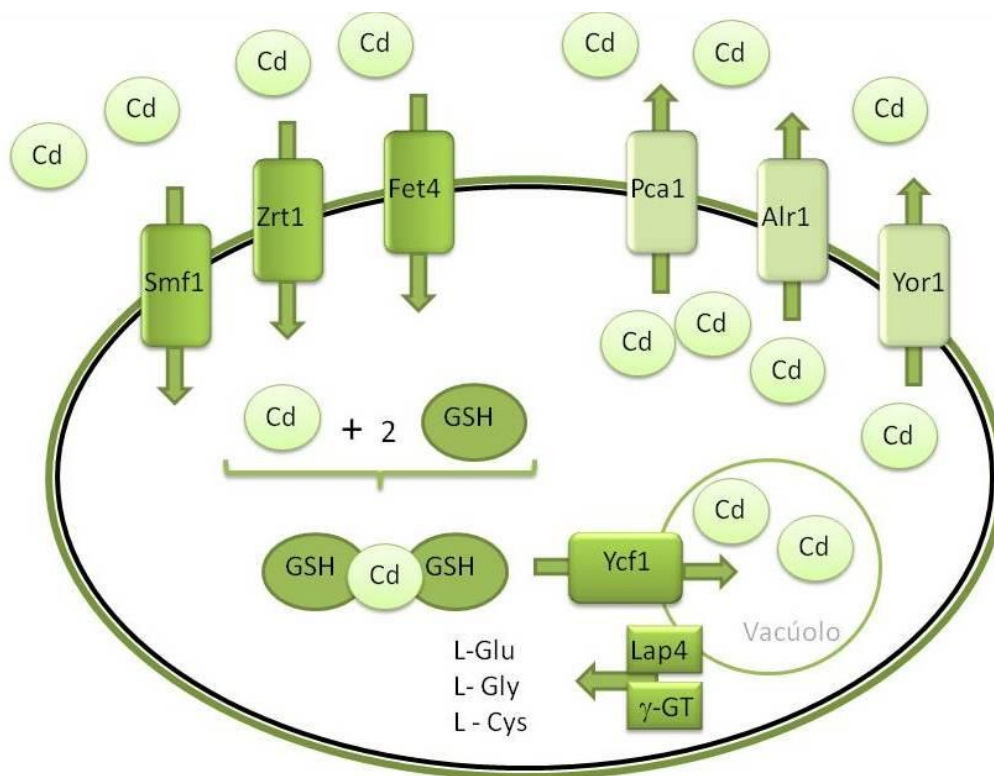


Figura 6 - Genes envolvidos no influxo e efluxo de Cd^{2+} em *S. cerevisiae*.

Após a entrada do Cd^{2+} no citoplasma, o metal pode ser sequestrado pelas moléculas relacionadas à defesa antioxidante celular, como metalotioneínas e a glutatona, ambas possuem resíduos sulfidrílicos em sua composição.

A glutatona é a principal responsável pela defesa celular contra o Cd^{2+} . Esta molécula se liga ao Cd^{2+} formando o complexo bis glutationato de cádmio ($\text{Cd}(\text{GS})_2$)

(Figura 7), que é formado por duas moléculas de glutathiona oxidada ligadas ao metal. Este complexo é transportado para o interior do vacúolo pela proteína Ycf1p (*Yeast cadmium factor 1*) (LI *et al.*, 1997). A Ycf1 é uma proteína da membrana vacuolar que pertence à família dos transportadores ABC, que são proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas. Esta proteína catalisa o transporte de vários substratos, incluindo substratos endógenos conjugados à GSH e o complexo Cd(GS)₂ (LI *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; REBBEOR *et al.*, 1998).

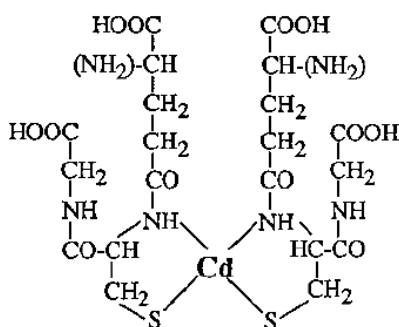


Figura 7 - Estrutura do complexo Cd(GS)₂ formado pelo cádmio e duas moléculas de glutathiona (LI *et al.*, 1997)

Trabalho realizado por Mehdi, (2001), mostrou que a glutathiona do complexo Cd(GS)₂, é degradada e seus aminoácidos usados como fonte de requerimentos nutricionais, porém pouco se sabe sobre este mecanismo de degradação e reciclagem do tripeptídeo. Estudo realizado por Adamis e colaboradores (2007), mostrou-se que a enzima gamma-glutamil transferase (γ -GT) ligada à membrana vacuolar, é responsável pela reciclagem do complexo Cd(GS)₂ estocado no vacúolo. Adamis e colaboradores (2009) demonstraram também que a proteína Lap4p participa na reciclagem de glutathiona juntamente com γ -GT.

Outra estratégia utilizada pelas células de *S. cerevisiae* para conter a toxicidade de Cd²⁺ é baseada no efluxo do metal para o ambiente extracelular. Existem três proteínas de membrana celular que auxiliam nessa desintoxicação: Pca1, Alr1 e Yor1p. A proteína Pca1p (*P-type cation-transporting ATPase*) caracterizada como uma bomba de efluxo de Cd²⁺, é regulada por um mecanismo pós-traducional que envolve seu rápido deslocamento para a membrana plasmática na presença de Cd²⁺ (ADLE *et al.*, 2007).

A proteína Alr1p (*Aluminium resistance 1*), é conhecida por seu papel no controle homeostático dos íons Mg^{2+} e está localizada na membrana plasmática de *S. cerevisiae* (MACDIARMIR & GARDNER 1998). Kern e colaboradores (2005) demonstraram que, em células de *S. cerevisiae*, a proteína Alr1p desempenha importante papel na desintoxicação de Cd^{2+} , devido a sua capacidade de executar o efluxo do metal para o meio extracelular.

O transportador Yor1p (*Yeast oligomycin resistance 1*), uma proteína de membrana pertencente à família de transportadores ABC, tem importante papel na resistência ao Cd^{2+} em células de leveduras quando submetidas a temperaturas de 23°C, resistência esta que ocorre pela capacidade da Yor1p transportar os complexos bisglutionato de cádmio ($Cd(GS)_2$) para fora da célula (NAGY *et al.*, 2006).

1.5.2 - Cádmio, estresse oxidativo e apoptose em *S. cerevisiae*

Muitos estudos têm apresentado os efeitos tóxicos e carcinogênicos induzidos em humanos e animais expostos a certos metais. É bem conhecido que vários metais de transição, tais como zinco, ferro, cobre, cobalto e manganês, participam do controle de várias vias metabólicas e de sinalização. De acordo com suas coordenações químicas e propriedades redox, os metais não essenciais são capazes de mimetizar metais essenciais, sendo transportados, compartimentalizados em tecidos e constituintes celulares, promovendo alterações na homeostase celular e nos mecanismos de controle. A ruptura desses mecanismos de controle pode levar os metais não essenciais a se ligarem a diversas biomoléculas (VALKO *et al.*, 2005).

A tolerância ao cádmio tem sido extensivamente analisada em uma grande variedade de organismos, dado a sua elevada toxicidade e pelo fato de não ser um elemento essencial. O cádmio não é utilizado em nenhum processo biológico conhecido, com uma única exceção, a alga *Thalassiosira weissflogii* que possui a enzima anidrase carbônica que é dependente do metal (LANE *et al.*, 2005).

Segundo Brady e Duncan (1994), Volesky (1990b) e Adamis e colaboradores (2007), é bem conhecido que microrganismos possuem capacidade de acumular cádmio, sendo assim, a levedura *S. cerevisiae* não é exceção. Em decorrência de sua química de

coordenação, este elemento pode ser potencialmente competitivo com outros cátions bivalentes tais como cálcio, magnésio e zinco, sendo transportado e compartimentalizado no interior da célula, conforme mostra a figura 5 (BRENNAN & SCHIESTL, 1996; GOMES *et al.*, 2002; NAGY *et al.*, 2006).

O cádmio é capaz de causar danos oxidativos agindo como redutor danificando defesas antioxidantes ou, inativando os acumuladores de radicais livres como as glutathionas, fitoquelatinas e metalotioneínas produzindo indiretamente as ROS (ERCAL *et al.*, 2001; SERERO *et al.*, 2008). Os efeitos indiretos causados pelo acúmulo deste metal podem levar a perda da função das proteínas, dano às membranas e morte celular, caso o reparo celular de DNA seja prejudicado (Figura 8) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BERTIN & AVERBECK, 2006).

Em *S. cerevisiae* a tolerância ao cádmio está associada à presença dos genes que codificam proteínas envolvidas nas defesas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, tioredoxina, glutathiona e tioredoxina redutase) e a do ativador transcricional básico *leucin-zipper* (bZIP), também conhecido como Yap1, para uma eficiente expressão destes genes. Leveduras expostas ao cádmio apresentam uma elevada quantidade de lipídeos de membrana danificados ou peroxidados. Também tem sido demonstrado *in vitro* que a expressão das enzimas Gpx1, Gpx2 e Gpx3 com atividade fosfolipídica hidropoxidase são capazes de remover peróxidos lipídicos em *S. cerevisiae* (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; BAUDOUIN-CORNU & LABARRE, 2006).

De acordo com Baudouin-Cornu e Labarre (2006), outra hipótese para a toxicidade do cádmio é a depleção de glutathiona do citosol. A via de detoxificação do cádmio envolve a quelação de glutathiona e, subsequentemente, o transporte do complexo Cd(GS)₂ para o vacúolo, assim contribuindo para a diminuição da glutathiona livre no citosol. Como consequência pode haver redução da atividade de enzimas dependentes de glutathiona, tais como glutathiona peroxidase, glutathiona S-transferase e glutaredoxinas, que são envolvidas na defesa do estresse oxidativo e outras funções essenciais das células.

A peroxidação de lipídeos parece ser muito comum na exposição ao cádmio. Reações de peroxidação de lipídeos após a exposição ao Cd não são totalmente conhecidas, mas acredita-se que distúrbios nas concentrações de GSH (glutathiona) e MT

(metalotioneína) permitam que radicais livres, tais como radical HO• e O₂•, ataquem os lipídeos de membrana e resultem assim em um aumento na peroxidação de lipídeos. Assim esses trabalhos concluíram que o cádmio causa estresse oxidativo de forma indireta, por meio da diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (BAUDOUIN-CORNU & LABARRE, 2006).

Os efeitos do cádmio na instabilidade genômica surgem de forma indireta principalmente, via o aumento do estresse oxidativo, podendo assim levar a danos ao DNA. Vários estudos indicam que o cádmio inibe o reparo do DNA. Assim, tem sido demonstrado que o cádmio interfere com, pelo menos, três vias de reparo distintas: reparo por excisão de bases (BER - *base excision repair*), reparo por excisão de nucleotídeo (NER - *nucleotide excision repair*) e reparo de erros no pareamento de bases (MMR - *mismatch repair*) (HOEIJMAKERS, 2001; GIAGINIS *et al.*, 2006).

O sistema de reparo BER, é o reparo onde a base errada é retirada por meio da quebra da ligação glicosídica entre a base e a ribose formando um sítio abásico ocorrendo a substituição da base (BERTIN & AVERBECK, 2006; GIAGINIS *et al.*, 2006). O tratamento com o Cd²⁺ diminui a eficiência de reparo de bases oxidadas do tipo 8-hidroxi guanina e inibe a atividade de proteína dos passos iniciais do BER (POTTS *et al.*, 2001; POTTS *et al.*, 2003).

O reparo por NER, consiste na retirada de alguns nucleotídeos erroneamente adicionados ao DNA que causam uma distorção no mesmo. A presença do cádmio prejudica a interação de proteínas das fases iniciais do NER (ASMUSS *et al.*, 2000; HOUBEN *et al.*, 2005).

O reparo MMR, trata do reparo do pareamento incorreto das bases nas fitas de DNA. Quando o MMR é inibido, não pode haver a correção ou troca da base adicionada errada na fita que está sendo sintetizada e, assim, pode haver o pareamento incorreto que resultará em mutagenese. O cádmio inibe o MMR, por meio da inativação da atividade de uma determinada ATPase que atua no reconhecimento precoce de erros de pareamento base-base (BANERJEE & FLORES-ROZAS, 2005). Se esses sistemas de reparos são inibidos ou impedidos de funcionar, dado a presença do cádmio, diversas alterações no DNA ocorreram, e assim o cádmio pode exercer seu papel mutagênico e genotóxico.

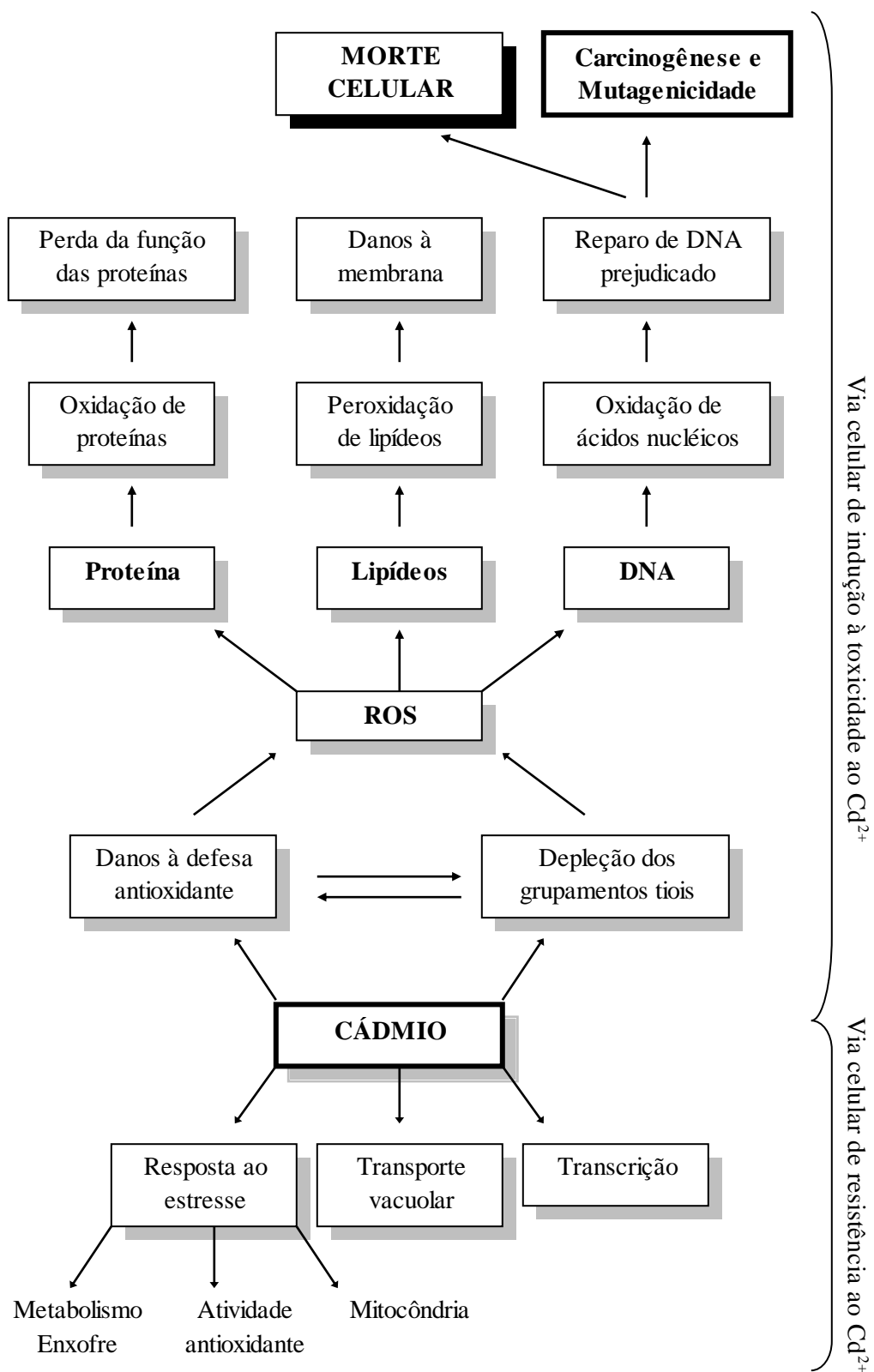


Figura 8 - Possíveis mecanismos de indução ao estresse oxidativo pelo cádmio. Adaptado de ERCAL *et al.*, (2001) e SERERO *et al.*, (2008).

1.6 - Trealose

A trealose (α -D-glicopiranosil-1,1- α glicopiranosídeo) é um dissacarídeo não redutor formado por dois resíduos de D-glicose que são ligadas por átomos do carbono alfa reduzido (Figura 9). É encontrada em bactérias, microrganismos eucarióticos, insetos e invertebrados, plantas, mas está ausente em mamíferos (BENAROUDJ *et al.*, 2001). As leveduras acumulam grande quantidade de trealose, tornando-se assim, excelentes modelos para o estudo da resposta das células eucarióticas a diversos estresses (PANEK, 1995).

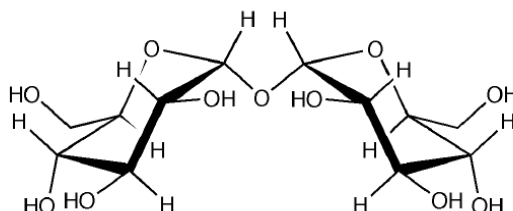


Figura 9 - Estrutura química da α,α -1,1 trealose. Fonte: ELBEIN *et al.* (2003).

Na levedura *S. cerevisiae*, a trealose é formada no citosol por uma reação em duas etapas (CABIB & LELOIR, 1958). Essa reação é conduzida por um complexo de três subunidades: (1) uma subunidade catalítica de 56 kDa que é a trealose-6-fosfato sintase codificada por TPS1 (BELL *et al.*, 1992) (EC2.4.1.15), (2) uma subunidade de 102,8 kDa que é a trealose-6-fosfato fosfatase codificada por TPS2 (DE VIRGILIO *et al.*, 1993) (EC.3.1.3.12), (3) a maior subunidade de 123-kDa codificada redundantemente por 2 genes, TSL1 (trealose sintase de cadeia longa) e TPS3 (homólogo a TSL1) com atividade regulatória (VUORIO *et al.*, 1993). Os mutantes com dupla deleção, TSL1 e TPS3, exibem uma grande desestabilização no complexo de síntese da trealose (BELL *et al.*, 1998).

Na primeira etapa de formação da trealose ocorre a condensação da uridina 5'- α -D-glicopiranosil pirofosfato (UDP glicose) e glicose-6-fosfato pela ação da trealose-6-fosfato sintase (*tps1*). Essa enzima transfere o resíduo glicosil do UDGP para a glicose-6-fosfato formando a trealose-6-fosfato. Na segunda etapa, a trealose-6-fosfato é defosforilada por uma fosfatase específica (trealose-6-fosfato-fosfatase/*tps2*) para

produzir a trealose (Figura 10). A quebra da trealose gera duas moléculas de glicose sendo realizada pelas enzimas trealases neutra ou ácida. Em *S. cerevisiae* a síntese da trealose é feita no citoplasma pelo complexo trealose-6-fosfato sintase/fosfatase (TPS) que contém trealose-6-fosfato sintase (Tps1p), trealose-6-fosfato fosfatase (Tps2p) e várias subunidades, tais como: Tps3p e Tsl1p, que aparecem tanto para estabilizar quanto para regular o complexo TPS (SAMPEDRO & URIBE, 2004).

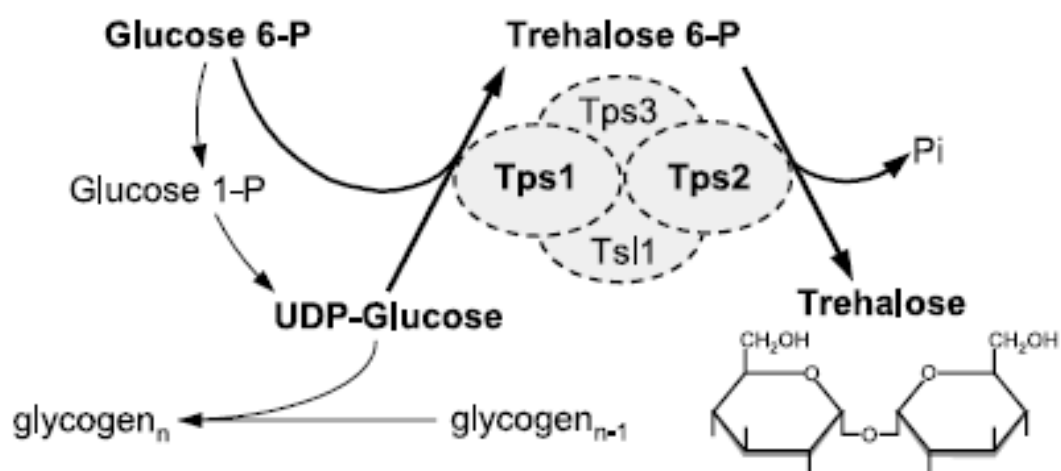


Figura 10 - Via da síntese de trealose em leveduras. Fonte: GANCEDO & FLORES, 2004.

Três enzimas são capazes de degradar trealose: duas trealases neutras ou intracelulares, e a trealase ácida, ou extracelular. As enzimas neutra e ácida diferem em função da sua localização celular, propriedades catalíticas e regulação (SAMPEDRO & URIBE 2004; PARROU *et al.*, 2005). A trealase neutra, sintetizada pelo gene NTH1 é uma enzima citoplasmática com atividade ótima em pH 7,0, o gene NTH2 sintetiza a outra trealase neutra que não se sabe na realidade qual a sua função. A trealase ácida, parece ser uma enzima encontrada na superfície celular, possui atividade ótima em pH 4,5, é responsável pela utilização da trealose externa como fonte de carbono (PARROU, *et al.*, 2005; TERESHINA, 2005).

Inicialmente a trealose foi descrita como fonte de armazenamento de glicose para energia e/ou para síntese de componentes celulares (Elbein, 1974). Porém, trabalhos posteriores mostraram que a trealose estaria também associada a funções de proteção em células expostas a condições adversas. Um dos primeiros trabalhos a

observar a função de proteção promovida pela trealose foi realizado em *Dictyostellium discoideum* (EMYANITOFF & WRIGHT, 1979) quando verificou-se que a presença da trealose em altas concentrações (40 mM) no meio de incubação, aumentava a sobrevivência de células expostas a temperaturas sub-letais (45°C) ou letais (55°C). Atualmente acredita-se que a principal função da trealose pode não ser atuar como reserva de energia e carbono, mas proteger contra estresses como desidratação (FRANÇA *et al.*, 2007), dessecação (LIU, *et al.*, 2005), congelamento, estresse térmico (HOTTINGER *et al.*, 1987), estresse osmótico (HOUSA, *et al.*, 1998), produtos químicos como metanol e peróxido de hidrogênio (BENAROUDJ, *et al.*, 2001), NaCl (MAHMUD *et al.*, 2009) e cobre (ATTFIELD, 1987). Também foi observado que a trealose protege indiretamente a enzima superóxido dismutase (SOD) e/ou elimina diretamente as ROS em plantas (LUO *et al.*, 2008).

O papel da trealose nessas condições é melhor entendido considerando o caso da dessecação (LIU, *et al.*, 2005). Em geral, as membranas biológicas quando são desidratadas perdem sua integridade estrutural e funcional. Se a desidratação é realizada em presença de trealose estes danos não ocorrem, provavelmente porque a trealose interage com fosfolípidos formando pontes de hidrogênio com seus grupos OH e os grupos fosfatos. Estas pontes de hidrogênio poderiam agir de maneira bastante similar às pontes de hidrogênio existentes entre lípidos e água. A especificidade da ligação entre a trealose e os grupos fosfato pode ser um importante fator na capacidade desta molécula em tomar o lugar da água em torno dos fosfolípidos estabilizando, desta forma, as membranas desidratadas.

2 - Justificativa

O estresse oxidativo induzido pelo cádmio é uma resposta complexa, multifacetada, com envolvimento de diversos genes e superposição de diferentes fatores. As nocivas consequências biológicas de altas doses de cádmio são bem documentadas, mas os mecanismos que levam à toxicidade não estão totalmente estabelecidos.

A levedura *S. cerevisiae* desenvolveu muitos mecanismos para lidar com o estresse oxidativo, entre estes mecanismos destacam-se a ativação de genes de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, os reparos de DNA, a indução da morte celular e da tolerância. Estudos correlacionando a influência da trealose no estresse oxidativo e na subsequente peroxidação lipídica induzida pela presença do cádmio não são conhecidos, assim como sua participação no controle redox da célula.

Trabalhos realizados com leveduras submetidas à desidratação mostram a importância da trealose na proteção às membranas e, de maneira geral, de proteção às células aumentando a sobrevivência das mesmas quando desafiadas com vários tipos de estresses como: choque térmico, etanol, desidratação, entre outros. É sabido que, geralmente, o estresse oxidativo induz a peroxidação lipídica e perda de potássio pelas células. Desse modo, é interessante conhecer como a ausência de trealose pode afetar células submetidas ao cádmio, um conhecido agente indutor do estresse oxidativo em *S. cerevisiae*.

Também é conhecido, que a remoção de lipídeos peroxidados é um dos mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo. A remoção de H₂O₂ e alkil hidroperóxidos é realizada pelas peroxiredoxinas. Esta classe de enzimas é encontrada em procariotos, eucariotos primitivos, plantas e mamíferos, sendo responsável pela remoção de lipídeos peroxidados. Todas as peroxiredoxinas contêm uma cisteína catalítica que é oxidada durante a redução dos peróxidos e é ela própria reduzida por equivalentes tióis redutores. *In vivo*, o sistema redutor encontrado em eucariotos consiste de NADPH, tioredoxina e tioredoxina redutase (sistema tioredoxina). Como ressaltado, a presença de cádmio induz grande peroxidação de lipídeos. Assim, decidimos verificar qual o resposta da linhagem mutante com deleção do gene que

codifica para uma das 5 peroxiredoxinas descritas na levedura *S. cerevisiae*, a enzima alquil hidroperoxido redutase (AHP1), após exposição ao cádmio.

Dado as considerações acima, selecionamos como marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e a determinação de resíduos sulfidrilicos livres após a exposição ao cádmio. A determinação da quantidade de lipídeos peroxidados é um indicativo da integridade de membrana e do ataque oxidativo aos lipídeos. A determinação de resíduos SH livres é uma forma indireta de se avaliar o estado redox da célula. Também foi analisada a viabilidade celular e, quando pertinente, o tipo de morte celular induzida na presença do metal. Em todos os experimentos, células metabolicamente ativas, em fase exponencial do crescimento, foram expostas ao cádmio.

A revisão da literatura mostra que a trealose é um carboidrato amplamente conhecido por suas funções de proteção em vários e diferentes estresses. Entretanto, a função deste carboidrato no estresse oxidativo induzido por um metal não redox, como o cádmio, não é bem conhecida, de forma que, consideramos relevante abordá-la. A enzima *ahp1p* é um componente do sistema peroxirredoxinas, parte do sistema de defesa antioxidante, que permite à levedura remover parte dos peróxidos lipídicos formados após a indução do estresse oxidativo.

A resposta das linhagens usadas pode ser analisada como paradigma da reação da levedura à exposição de metais não essenciais.

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar o papel da trealose, peroxidação lipídica e transportadores de potássio no estresse oxidativo induzido pelo cádmio em linhagens de *S. cerevisiae* com deleções nos genes relacionados a estes processos.

3.2 - Objetivos Específicos

Usar diferentes mutantes de *S. cerevisiae* para verificar:

- a tolerância das linhagens às concentrações crescentes de cádmio;
- a integridade de membrana após incorporação de Cd²⁺
- a viabilidade metabólica após incorporação de Cd²⁺;
- a determinação da quantidade de Cd²⁺ incorporado;
- a determinação da quantidade de potássio intracelular;
- a captação de ¹⁰⁹Cádmio;
- a influência do cádmio na geração de radicais livres;
- a influência do cádmio na peroxidação de lipídeos;
- a influência do cádmio nos resíduos sulfidrílicos totais;
- a indução de apoptose, por meio de marcadores específicos (DAPI e Laranja de Acridina).

4 - Materiais e Métodos

4.1 - Linhagens de estudo

Neste trabalho, foram utilizadas diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentam deleção em genes que possivelmente podem estar envolvidos no estresse oxidativo. Todas as linhagens foram obtidas da Euroscarf, Frankfurt, Alemanha.

Tabela 2 - Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas

Linhagem	Genótipos	Fenótipos
BY4741-WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Selvagem
<i>tps1</i>	<i>MATa; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; YBR126c::kanMX4</i>	Deleção do gene que codifica a enzima trealose-6-fosfato sintase
<i>ahp1</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDR305c::kanMX4</i>	Deleção do gene que codifica a enzima alquil hidroperóxido reductase 1 (Ahp1)
<i>trk1</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YJL129c::kanMX4</i>	Deleção do transportador de potássio (K). Transportador de alta afinidade (180 kDa), possui atividade regulada por fosforilação.
<i>trk2</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YKR050w::kanMX4</i>	Deleção do transportador de potássio (K).

Origem: Euroscarf

4.2 - Meios de cultura

O crescimento das células foi realizado nos seguintes meios: YPD composto de 2% de glicose, 2% de peptona e 1% de extrato de levedura e YNB modificado composto de 0,67% YNB com aminoácido, 2% glicose, 0,52% citrato de sódio e 0,7 de ácido cítrico.

4.3 - Estresse com cloreto de cádmio

As células foram pré incubadas a uma temperatura de 30°C, agitadas a 160 rpm por um período de aproximadamente 16 horas, em meio líquido YPD. Após este período, o meio foi centrifugado por 5 minutos a 3000 r.p.m., o sobrenadante descartado e as células foram transferidas para um novo meio líquido YPD, por um período de 4 horas, para que assim as células entrassem em fase exponencial de crescimento. De acordo com a necessidade experimental, as células foram incubadas em meio YNB (com aminoácido) acrescido de concentrações pré-estabelecidas de CdCl₂ e também na condição controle (ausência de cádmio). O cloreto de cádmio foi esterilizado por autoclavagem isoladamente, em solução aquosa concentrada e, adicionado ao meio YPD. Posteriormente, as células foram incubadas em meio YPD a 30°C, sob agitação a 160 r.p.m., durante períodos de tempo pré-estabelecidos. O tempo de incubação e a concentração de cloreto de cádmio foram variáveis, de acordo com a necessidade de cada experimento.

Para realização das determinações de cádmio, potássio, peroxidação de lipídios e resíduos sulfidrílicos após o tempo estabelecido, as células foram coletadas por filtração a vácuo usando filtros de nitrocelulose de 0,45 µm de porosidade, 47 mm de diâmetro. As células foram lavadas com 15 mL de água destilada fria. A massa celular foi removida do filtro com espátula, transferida para papel alumínio, congelada em nitrogênio líquido, e estocada em freezer – 20°C. Posteriormente, esta massa de células congelada foi utilizada para as determinações experimentais desejadas.

Para a verificação dos possíveis mecanismos envolvidos em morte celular, após a incubação foi retirado 1 mL de cada condição (controle, 0,5 mM e 4 mM de CdCl₂) e utilizado para as determinações desejadas.

4.4 - Determinação da quantidade de cádmio e potássio em *S. cerevisiae*

Após a realização do item 4.3 foi realizada a análise por ativação neutrônica, para determinação do cádmio incorporado pelas células e a quantidade de potássio intracelular (realizadas na mesma amostra). A análise por ativação neutrônica tem sido reconhecida como uma das mais importantes ferramentas analíticas na determinação da composição química elementar em teores traços. A técnica tem como princípio à indução de radioatividade artificial, em uma amostra pela irradiação com nêutrons e, posterior medida da atividade induzida mediante a detecção da radiação gama. Os fenômenos físicos na qual está fundamentada esta análise são: as propriedades do núcleo, radioatividade e a interação da radiação com a matéria, via reação de nêutrons-gama (n, γ). Os raios gama emitidos, denominados de raios gama de decaimento, possuem energias que são características de cada radionuclídeo. Assim, quando detectados por espectroscopia gama, podem ser utilizados para identificar e quantificar os elementos químicos presentes em uma amostra.

A ativação neutrônica foi realizada no reator TRIGA MARK 1 IPR-R1 que está localizado no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN) que possui três dispositivos de irradiação: a mesa giratória, tubo central e tubo pneumático. A mesa giratória possui 40 canais de irradiação fora do reator na qual é capaz de irradiar uma larga escala de isótopos. O tubo central se encontra no centro do reator e permite à amostra uma irradiação com fluxo máximo de nêutrons. O tubo pneumático permite a análise de radioisótopos de meia vida curta (ZANGIROLAMI *et al.*, 2010).

O reator foi produzido pela General Atomics e trabalha em uma potência de 100kW. O fluxo de nêutrons na mesa giratória para nêutrons térmicos é de $8,2 \times 10^{11}$ n.cm⁻².s⁻¹ e para nêutrons epitérmicos é de $3,5 \times 10^{10}$ n.cm⁻².s⁻¹. O fluxo de nêutrons epitérmicos no tubo central é de $2,6 \times 10^{11}$ n.cm⁻².s⁻¹ e no tubo pneumático é de $2,5 \times 10^{11}$ n.cm⁻².s⁻¹. A meia vida do ¹¹⁵Cd é de 12,2 dias. Após irradiação e determinado tempo de decaimento as amostras são submetidas à espectroscopia gama em um sistema equipado com detector hiper puro de germânio (HPGe) CAMBERRA 5019 e software Gennie 2000 v2.0 CAMBERRA (ZANGIROLAMI *et al.*, 2010).

4.5 - Incorporação de ^{109}Cd

Células crescidas nas condições especificadas no item 4.3 foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em meio contendo 10 mL de meio YNB contendo 2% de glicose, 1 mM de CdCl_2 e $0,23\mu\text{Ci/mL}$ de ^{109}Cd e 2×10^8 células/mL. A suspensão foi incubada durante 24 horas a 30°C , sob agitação. Amostras de 1 mL foram coletas em intervalos de 6 horas e imediatamente filtradas com auxílio de bomba a vácuo, lavadas duas vezes com água estéril. Os filtros de fibra de vidro (24 mm diâmetro) foram retirados e secos em estufa (70°C). A radioatividade incorporada foi determinada em contador gama (Wallac Wizard 1480).

4.6 - Obtenção de extratos celulares

Para a determinação de lipídeos peroxidados e resíduos sulfidrílicos após a realização da incubação descrita no item 4.3, onde as células foram coletadas em fase logarítmica, e incubadas em meio YPD novo, na ausência (controle) e presença de 0,5 e 4 mM de cloreto de cádmio, as células foram ressuspensas em tampão de lise gelado (tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM e PMSF 1 mM), adicionou-se, a seguir, pérolas de vidro (diâmetro de 710-1.180 microns). A ruptura das células foi realizada por seis ciclos de 30 segundos de agitação vigorosa em vórtex, intercalados com períodos de repouso em gelo. Após a lise celular, a suspensão foi centrifugada a 3000 r.p.m. por 5 minutos. Utilizou-se este sobrenadante (extrato bruto) para a realização das dosagens necessárias.

4.7 - Dosagem de proteínas

O conteúdo protéico dos extratos brutos de cada amostra foi determinado de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando uma solução de soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

4.8 - Tolerância ao cádmio

A análise de sobrevivência das células ao cloreto de cádmio foi feita por plaqueamento em meio de cultura YPD acrescido de ágar. Foram preparados pré inóculos das linhagens em meio YPD e, após 48 horas de crescimento foi feita contagem do número de células, com uso da câmara de Neubauer. Foram coletados 100µL de cada pré-inóculo e realizadas diluições sucessivas em água destilada estéril, obtendo assim as concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 células/mL. Em seguida, foram inoculados 5µL de cada suspensão em placas contendo YPD + ágar com concentrações de CdCl_2 de 0,05, 0,075, 0,1, 0,125mM e controle. Após 72 horas de incubação a 30°C as placas foram fotografadas.

4.9 - Análise da viabilidade celular

4.9.1 - Análise da integridade de membrana com Brometo de Etídio

O brometo de etídio (figura 11) é um corante usado para caracterizar integridade de membrana. Ele penetra nas células que não apresentam a membrana íntegra e se cora de vermelho quando submetido à fluorescência (KALVELYTE *et al.*, 2003).

A análise foi iniciada com todas as amostras contendo 2×10^8 células/mL. Após 24 horas de incubação com as concentrações de 0,5 mM e 4 mM de CdCl_2 , e na situação controle, as células foram lavadas com PBS estéril por duas vezes. As células então foram incubadas com tampão de lise composto por 15 U de liticase, 5,5% de glusulase e 1 M de Tampão Sorbitol durante duas horas a 30°C. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e então incubadas com 0,1µg/mL de brometo de etídio (BE) em 1mL de PBS durante 15 minutos a 30°C. Após a incubação as células foram lavadas com PBS e então colocadas em lâminas e visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axionplan acoplado a uma câmera digital (MADEO *et al.*, 1997).

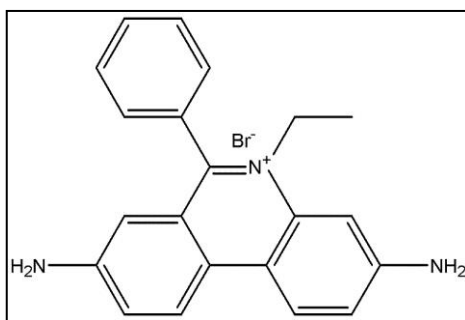


Figura 11- Estrutura do brometo de etídio (3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenatridina).

4.9.2 - Análise da atividade metabólica com uso da Floxina B

A viabilidade das células de *S. cerevisiae* foi avaliada utilizando o corante fluorescente floxina B (Figura 12). Este marcador é absorvido pelas células de forma passiva e é, então, ativamente excretado pelas células metabolicamente ativas (ROUX *et al.*, 2006).

A análise foi iniciada com todas as amostras contendo 2×10^8 células/mL. Após 24 horas de incubação com as concentrações de 0,5 mM e 4 mM de CdCl₂ e na situação controle, as células foram lavadas com PBS estéril por duas vezes. As células então foram incubadas com 0,4 mg/mL de floxina B durante 2 horas a 30°C. Após a incubação as células foram lavadas três vezes com PBS e então colocadas em lâminas e visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axionplan acoplado a uma câmera digital (EISLER *et al.*, 2004).

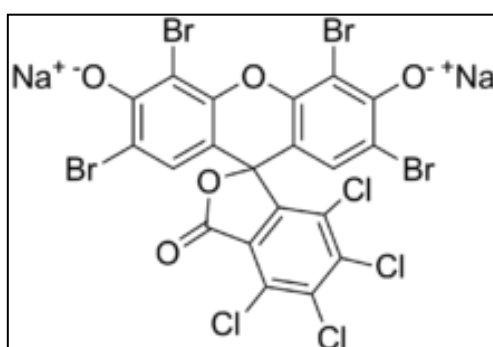


Figura 12 - Estrutura da floxina B.

4.10 - Resíduos Sulfidrílicos Totais

Os resíduos sulfidrílicos totais foram determinados pelos métodos de ELLMAN (1959) e DAVIDSON e colaboradores (2001), usando 5-5´dithio-bis 2-ácido-nitrobenzoico - DTNB. Na presença de grupamento tiol a solução de DTNB forma 5-Mercapto-2-Nitrobenzoico, produzindo uma coloração amarela característica que pode ser determinada espectrofotometricamente a 412 nm (Figura 13).

Após a incubação realizada de acordo com o item 4.3, os extratos celulares foram preparados de acordo com o item 4.5. Utiliza-se 0,5 mg de proteína diluída em tampão 0,1M de fosfato de sódio com pH 7,0. Retirou-se 200µL de cada preparação e, adicionou-se tampão 0,01M fosfato de sódio, p.H. 8,0 e 7µL de reagente Ellman (0,01M DTNB em 10mL de tampão 0,1M de fosfato de sódio pH 7,0). A absorbância foi determinada a 412nm após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente. O coeficiente de extinção molar para o DTNB é $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e foi usado para determinar a concentração de resíduos sulfidrílicos totais.

Os resultados foram expressos em micromoles de resíduos sulfidrílicos por miligrama de proteína por mL ($\mu\text{moles/mg}$ proteína).

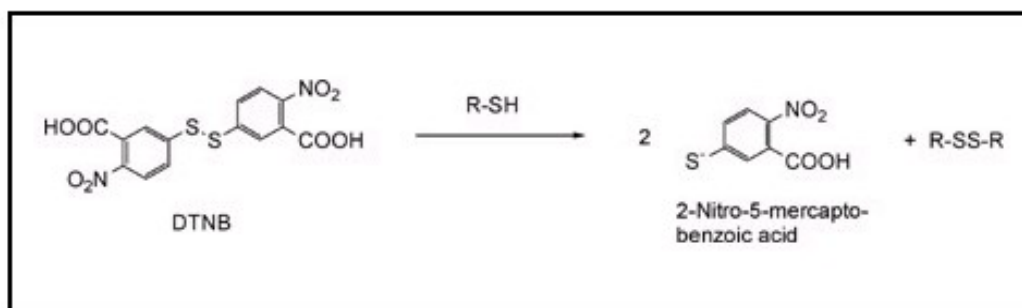


Figura 13 - Reagente Ellman

4.11 - Peroxidação de lipídeos

A determinação da peroxidação lipídica foi feita pelo método TBARS (do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Species*) ou substâncias reativas com o ácido tiobarbiturico descrito por Howlett e Avery (1997a; 1997b). A quantidade de lipídeos peroxidados foi determinada de acordo com as substâncias que reagiram com o ácido tiobarbitúrico. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são compostas

de diversos produtos finais de baixo peso molecular formados via decomposição de certos produtos primários e secundários da peroxidação lipídica. A análise da quantidade de TBARS é utilizada como um índice de estresse oxidativo. O cálculo foi realizado usando-se uma curva padrão de malondialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica (Figura 14).

Após a incubação realizada de acordo com o item 4.3, os extratos celulares foram preparados de acordo com o item 4.5. Ao sobrenadante previamente separado, adicionou-se ácido tricloracético (TCA, concentração final de 10%) e, a suspensão foi deixada em gelo durante 30 minutos. Após este período, foi centrifugada (3000 r.p.m. por 5 minutos) e retirou-se 600µL do sobrenadante ao qual se adicionou a solução de TBA (0,5% de ácido tiobarbitúrico preparado em TCA 20%). Após aquecimento por 60 minutos a 100°C, a amostra foi deixada à temperatura ambiente para resfriamento. Após esta etapa, a absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 532nm. As medidas foram corrigidas para turbidez inespecífica pela subtração da absorbância a 600nm. O índice de peroxidação lipídica foi expresso em picomoles de malondialdeído (produto da reação) por miligrama de proteína por mL (picomoles MDA/mg proteína).

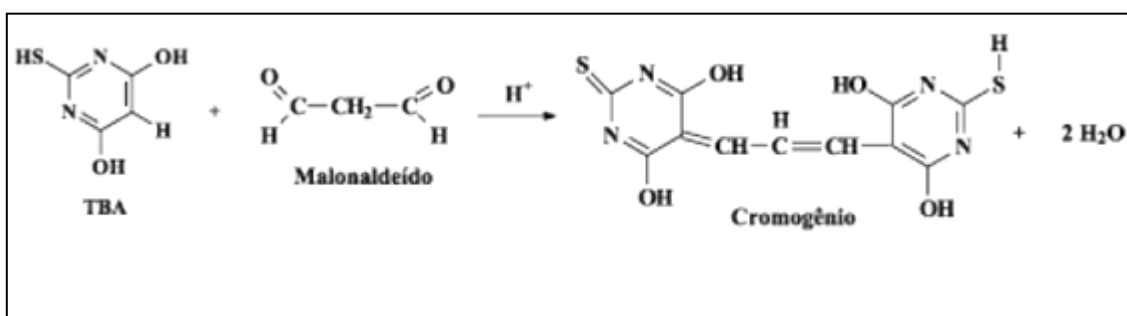


Figura 14 - Reação de TBARS entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído, formando o complexo colorido TBA-MDA (PUNTEL, 2008).

4.12 - Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio

A avaliação da geração de ROS foi realizada utilizando a sonda fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Esta molécula penetra na membrana celular por difusão passiva. Quando encontra-se no interior da célula, a molécula sofre deacetilação pela ação das esterases intracelulares formando a diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Quando existe a presença das ROS na célula, esta

molécula é oxidada formando a diclorofluorescína (DCF), que é uma molécula fluorescente (Figura 15) (RHEE *et al.*, 2010).

A quantidade de célula utilizada foi igual a 2×10^8 células/mL. Após incubação com cloreto de cádmio (item 4.3) as células foram lavadas uma vez com PBS estéril. As células foram então incubadas com 0,05 mM de DCFH-DA durante duas horas a 30°C no escuro.

Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e foi retirado 10µL do sobrenadante, colocado em lâminas e visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axionplan acoplado a uma câmera digital.

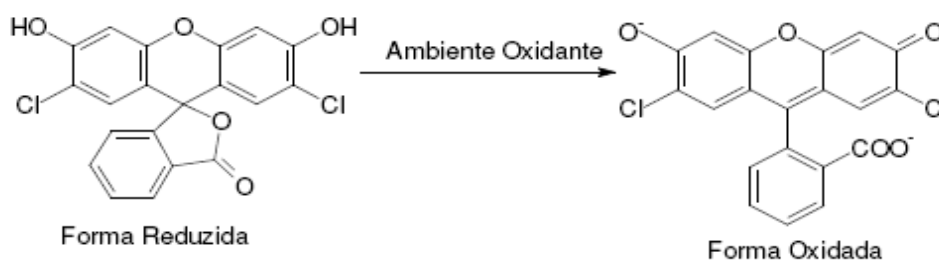


Figura 15 - Esquema mostrando a oxidação da sonda fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato.

4.13 - Avaliação do mecanismo de morte

4.13.1 - Avaliação das alterações nucleares via coloração com DAPI

O núcleo de células apoptóticas apresenta cromatina condensada que pode ser corada por 4'6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI – Molecular Probes). O DAPI é um marcador amplamente utilizado para técnicas fluorescentes corando núcleos especificamente, com pouca ou nula marcação de citoplasma (Molecular Probes®).

A coloração com DAPI procedeu-se utilizando o método descrito em Madeo (1997). A quantidade de célula utilizada foi igual a 2×10^8 células/mL. Após incubação com cloreto de cádmio as células foram lavadas uma vez com PBS estéril e, então, incubadas com 0,5µg/mL de DAPI durante 15 minutos.

Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e foi retirado 10µL do sobrenadante, colocado em lâminas e a visualização dos núcleos das células corados com DAPI foi feita em microscópio de fluorescência Zeiss Axionplan acoplado a uma câmera digital.

4.13.2 - Avaliação das alterações nucleares por meio da coloração com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio

A laranja de acridina (LA) é um corante fluorescente catiônico seletivo para ácidos nucléicos utilizado para a determinação do ciclo celular. Trata-se de um corante permeável à membrana celular que interage com o DNA e RNA por intercalação ou atrações eletrostáticas, respectivamente. Quando ligado ao DNA, possui uma excitação máxima de 502 nm e emissão máxima a 525 nm (verde), e quando associada com o RNA, a excitação máxima é 460 nm (azul) e a emissão máxima é de 650 nm (vermelho) (TOMITA, 2005).

A quantidade de células utilizadas foi igual a 2×10^8 células/mL. Após incubação com cloreto de cádmio as células foram lavadas uma vez com PBS estéril. As células foram então incubadas com tampão de lise, composto por 15U de liticase, 5,5% de glusolase e 1M de Tampão Sorbitol durante duas horas a 30°C e lavadas três vezes com PBS. As células foram incubadas com 0,1µg/mL de brometo de Etídio e 10µL de Laranja de Acridina em 1mL de PBS durante 15 minutos no escuro

Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e foi retirado 10µL do sobrenadante, colocado em lâminas e a visualização dos núcleos das células corados com Laranja de Acridina e Brometo de etídio foi feita em microscópio de fluorescência Zeiss Axionplan acoplado a uma câmera digital.

4.14 - Descarte de Rejeitos

4.14.1 - Descarte de rejeito químico

Todos os meios de cultivo contendo cádmio, brometo de etídio e DAPI foram segregados individualmente e estocados no laboratório, em bombonas plásticas colocadas dentro de caixas plásticas, com etiquetas identificando rejeito químico contendo cádmio, brometo de etídio e DAPI. Quando esgotada a capacidade de

armazenamento, foram enviadas ao Serviço de Gerência de Rejeitos do CDTN que o manterá sob sua guarda até a destinação final do rejeito.

4.14.2 - Descarte de rejeito radioativo – Cd¹⁰⁹

Os experimentos com radioativo foram realizados obedecendo aos cuidados de radioproteção, de acordo com a norma CNEN-NE-3.01, tais como, uso de blindagem de acrílico revestido com chumbo; uso dos equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas cirúrgicas descartáveis, óculos de segurança, jalecos, dosímetros individuais; bancadas devidamente forradas com plásticos e papéis toalha; monitorações de superfícies com o detector Geiger-Müller. Os rejeitos foram separados quanto ao tipo de material (sólido ou líquido) e acondicionados em sacos plásticos, lixeiras blindadas e bombonas de polipropileno até o completo decaimento. Após o decaimento, os rejeitos foram recolhidos pelo setor de rejeitos do CDTN.

4.15 - Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos diferentes. A diferença estatística dos resultados foi realizada utilizando o ANOVA acompanhado do Teste de Múltiplas Comparações Tukey-Kramer *pos-hoc* com níveis de significância de $p < 0,05$.

5 - Resultados e Discussão

5.1 - Tolerância das linhagens de *S. cerevisiae* ao cádmio

A fim de se avaliar a tolerância das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* ao cádmio, as suspensões de células foram inoculadas em meio YPD sólido, suplementado com concentrações crescentes de CdCl_2 (0,05, 0,075, 0,1 e 0,125 mM) e na ausência deste metal.

A análise do crescimento das linhagens pela formação de colônias, na presença de concentrações crescentes de cloreto de cádmio, foi comparada com a situação controle (formação de colônias em meio YPD na ausência de CdCl_2) em todos os experimentos. Conforme resultados apresentados na figura 16, todas as linhagens apresentaram, na ausência de cádmio, o perfil de crescimento esperado, apresentando diminuição da formação de colônia na medida em que a diluição aumentava. Com a adição de concentrações crescentes de cádmio observa-se a inibição ou redução na formação de colônias em todas as linhagens, comparativamente à situação controle, no período de tempo estudado (72 horas).

Na concentração de 0,125 mM de CdCl_2 houve a formação de colônias nas linhagens *WT*, *trk1Δ*, *trk2Δ* até a diluição de 10^6 células/mL, enquanto na linhagem *tps1Δ* apenas usando inóculo com maior densidade de célula (10^7 células/ml) houve formação de colônias. A linhagem *ahp1Δ* não foi capaz de se dividir e formar colônias na presença de 0,125 mM de CdCl_2 em qualquer umas das concentrações de células usadas. Concentrações acima de 0,125 mM inibem a formação de colônias em todas as linhagens (dados não apresentados).

Os resultados apresentados na figura 16 indicam que as linhagens usadas apresentam variações na tolerância ao Cd, sendo a linhagem *ahp1Δ* a mais sensível. Os diferentes graus de tolerância ao cádmio, e a qualquer outro composto químico são bem conhecidos. Estudos realizados por Lee e colaboradores (1999) e Farcanasu e colaboradores (1999) mostraram que a deleção no gene *AHP1* acarreta às leveduras maior sensibilidade a diferentes compostos como *tert*-butil hidroperóxido (t-BOOH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Haddad-Ribeiro (2009) em estudos com *S. cerevisiae* isoladas da fermentação da cachaça observou que estas linhagens apresentaram maior tolerância que a linhagem laboratorial (*W303-WT*) à concentração de 0,5mM de cádmio,

demonstrando que as leveduras obtidas desse habitat são, em geral, mais tolerantes ao efeito do cádmio. Gomes e colaboradores (2002) testaram linhagens de *S. cerevisiae*, com deleção nos genes transportadores de zinco (*zrt1Δ*) e nos genes de síntese de glutatona (*gsh1Δ* e *gsh2Δ*) e observaram que estas apresentaram formação de colônias em placas suplementadas com 0,15 mM de CdCl₂.

De acordo com a literatura, o efeito inibitório do cádmio sobre o crescimento celular se deve a vários fatores, todos eles ligados ao bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes tais como: enzimas, polinucleotídeos, sistema de transporte de íons ou nutrientes e substituição de íons essenciais em sítios ativos.

O cádmio é o exemplo típico de metal cuja toxicidade depende de sua habilidade em produzir complexos e possui alta afinidade pelos grupos sulfidrílicos. Muitos efeitos do cádmio decorrem do fato que este metal pode substituir o zinco em processos metabólicos importantes, já que estes dois metais possuem muitas similaridades químicas. Zinco e cádmio pertencem ao mesmo grupo da tabela periódica (2B), apresentam os subníveis 3d e 4d completos, ambos tem valência II, são estáveis na forma de cátions divalentes (Cd²⁺ e Zn²⁺) e não sofrem mudanças no número de oxidação (BRZÓSKA & MONIUSZKO-JAKONIUK, 2001; MARTELLI *et al.*, 2006). Assim, quando o cádmio é absorvido pelos organismos pode substituir o zinco em enzimas, acarretando uma diminuição ou perda completa da atividade (MARTELLI *et al.*, 2006). Além disso, o zinco é co-fator em diversas enzimas reguladoras, incluindo enzimas de síntese de DNA, RNA e reparo, e a substituição pelo cádmio implica em prejuízo no funcionamento destas enzimas (GLAGINIS *et al.*, 2006). O cádmio e o zinco podem se ligar às macromoléculas pelos elementos enxofre, oxigênio e nitrogênio. O cádmio apresenta afinidade por moléculas que contém o grupamento sulfidrílica livre (SH), assim existe extensiva ligação à glutatona diminuindo a disponibilidade da glutatona reduzida nos processos antioxidantes e redox. De acordo com Brzóska & Moniuszko-Jakoniuk (2001) a afinidade de cádmio é um pouco maior que a do zinco pelos resíduos SH.

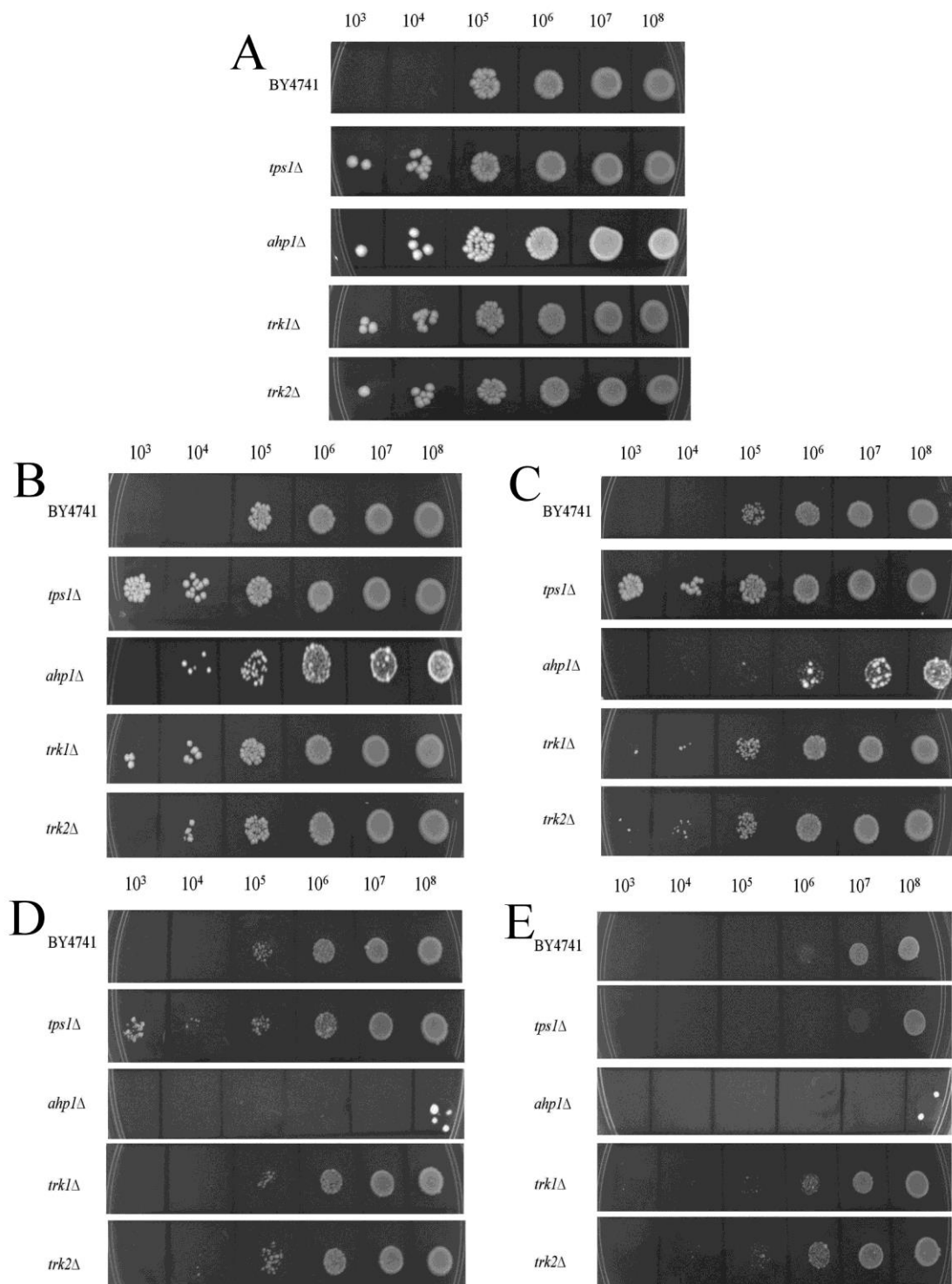


Figura 16 – Tolerância das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* ao CdCl₂- As células foram plaqueadas em meio YPD acrescido de 2% de agar na ausência de cloreto de cádmio (A) e na presença de 0,05 mM (B), 0,075 mM (C), 0,1 mM (D) e 0,125 mM (E), incubadas durante 72 horas e em seguida fotografadas.

5.2 – Avaliação da viabilidade celular após 24 horas de exposição ao CdCl₂

Em estudos prévios (não apresentados) verificamos que concentrações abaixo de 0,5 mM não desencadearam qualquer alteração nos parâmetros oxidativos, como: peroxidação lipídica e resíduos sulfidrílicos, que foram selecionados para a realização deste trabalho. Assim, nosso estudo dos papéis das diferentes mutações após a incubação com cádmio foram realizados com as concentrações de 0,5 mM (primeira concentração que apresentou alterações nos parâmetros oxidativos) e 4 mM concentração mais alta estudada.

Observamos na figura 16 que a inibição do crescimento é praticamente total na concentração 0,125 mM, onde as colônias não são visualizadas, tal resultado nos levou a verificar se as células se encontravam viáveis, uma vez que determinamos alterações nos indicadores oxidativos em concentrações superiores a àquelas em que as células não foram capazes de se dividirem e formarem novas células filhas como apresentado na figura 16. Para isso utilizou-se brometo de etídio, um marcador de integridade de membrana celular e a floxina B, marcador fluorescente para análise da viabilidade metabólica.

5.2.1 – Avaliação da integridade da membrana com o uso do brometo de etídio

O brometo de etídio é um corante que só consegue passar pela membrana de células mortas, dado que nestas condições a membrana celular se apresenta com grandes alterações, possibilitando assim a passagem deste corante. O brometo de etídio ao ser exposto à fluorescência (comprimento de excitação e emissão) emite uma coloração vermelha, permitindo a visualização, sob microscópio de fluorescência, de células coradas em vermelho. A literatura disponível considera que a visualização das células coradas significa a determinação da quantidade de células mortas (EISLER *et al*, 2004).

Após incubação durante 24 horas com as concentrações de 0,5 mM e 4 mM de cloreto de cádmio, observamos que todas as linhagens (*BY4741-WT*, *tps1Δ*, *ahp1Δ*, *trk1Δ* e *trk2Δ*), apresentaram menos de 10% coradas com brometo de etídio, ou seja, menos de 10% apresentavam comprometimento na integridade de membrana (Figura

17) e assim foram avaliadas como mortas. Ressalta-se que nestas condições experimentais mais de 90% das células estavam viáveis.

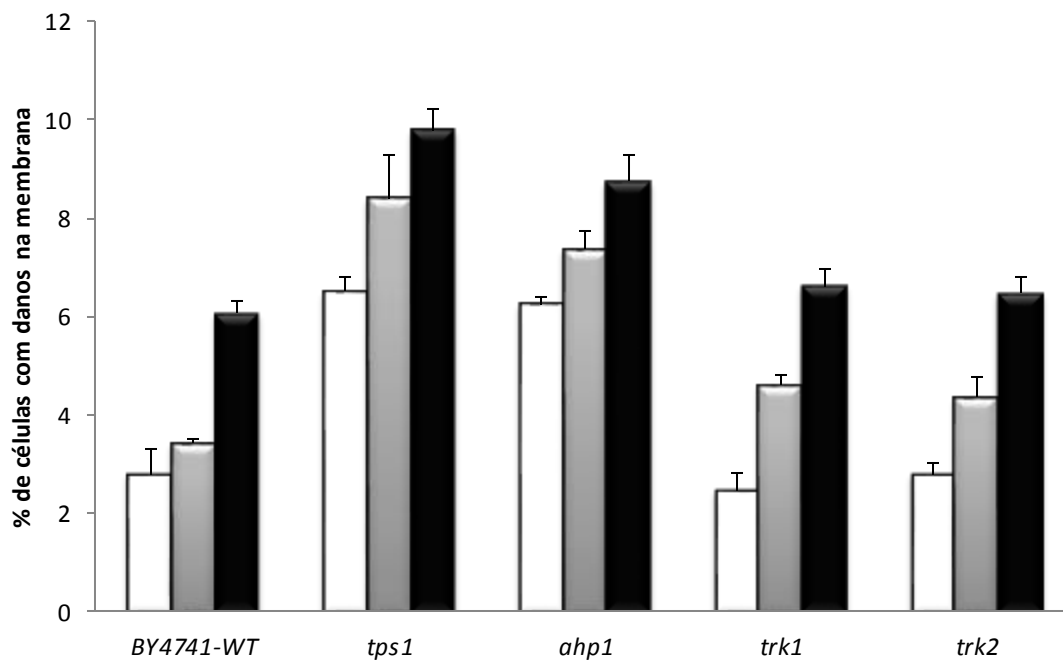


Figura 17 - Análise da integridade da membrana utilizando brometo de etídio nas linhagens *BY4741-WT*, *tps1* Δ , *ahp1* Δ , *trk1* Δ e *trk2* Δ . □ Controle, ■ 0,5 mM e ■ 4 mM. Após incubação com CdCl₂ durante 24 horas, as células foram lavadas e incubadas com brometo de etídio e então fotografadas.

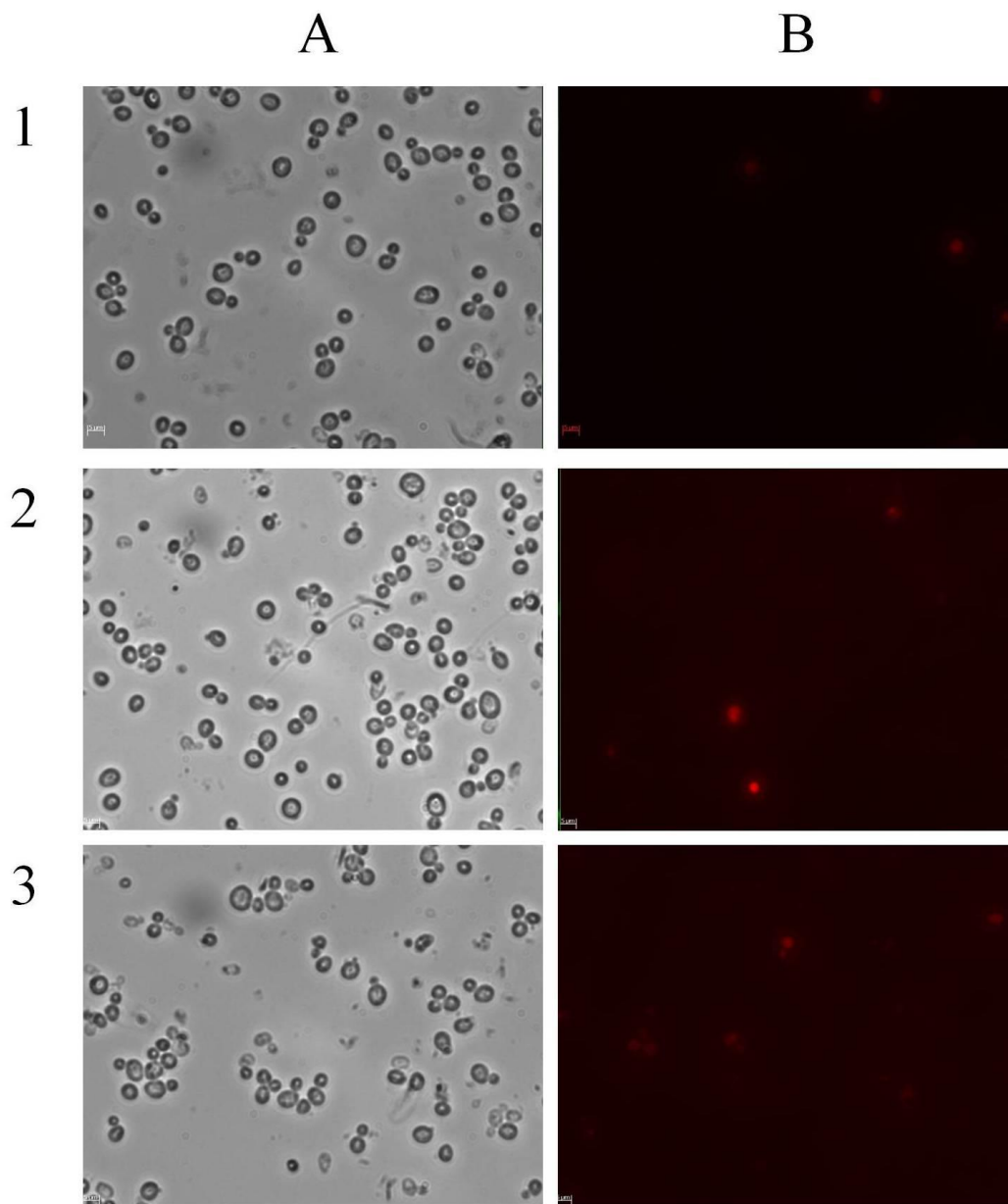


Figura 18 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem *BY4741-WT*. A coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etídio. Na linha (1) Controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

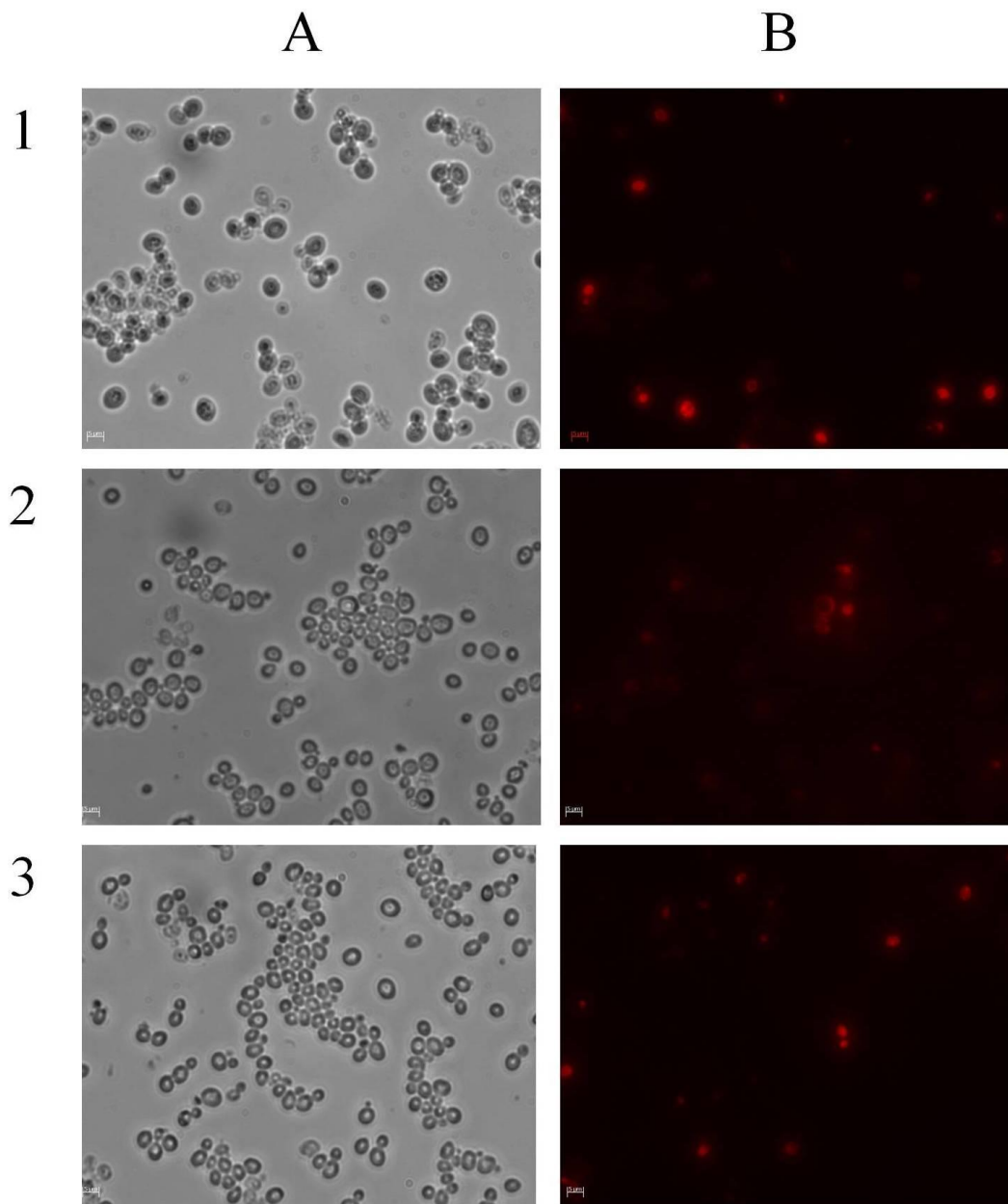


Figura 19 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem *tps1Δ*. A coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etídio. Na linha (1) Controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

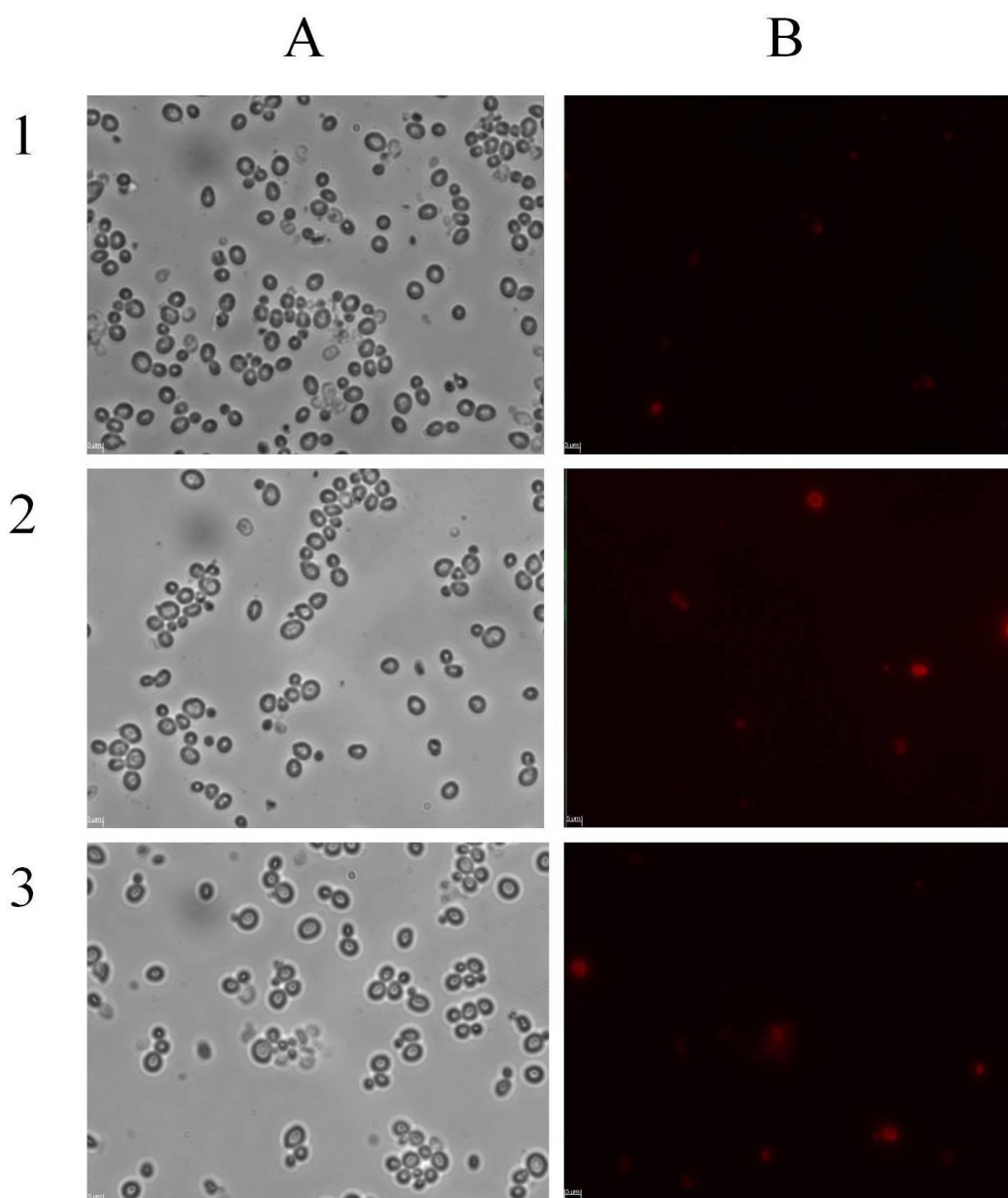


Figura 20 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem *ahp1Δ*. A coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etídio. Na linha (1) Controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

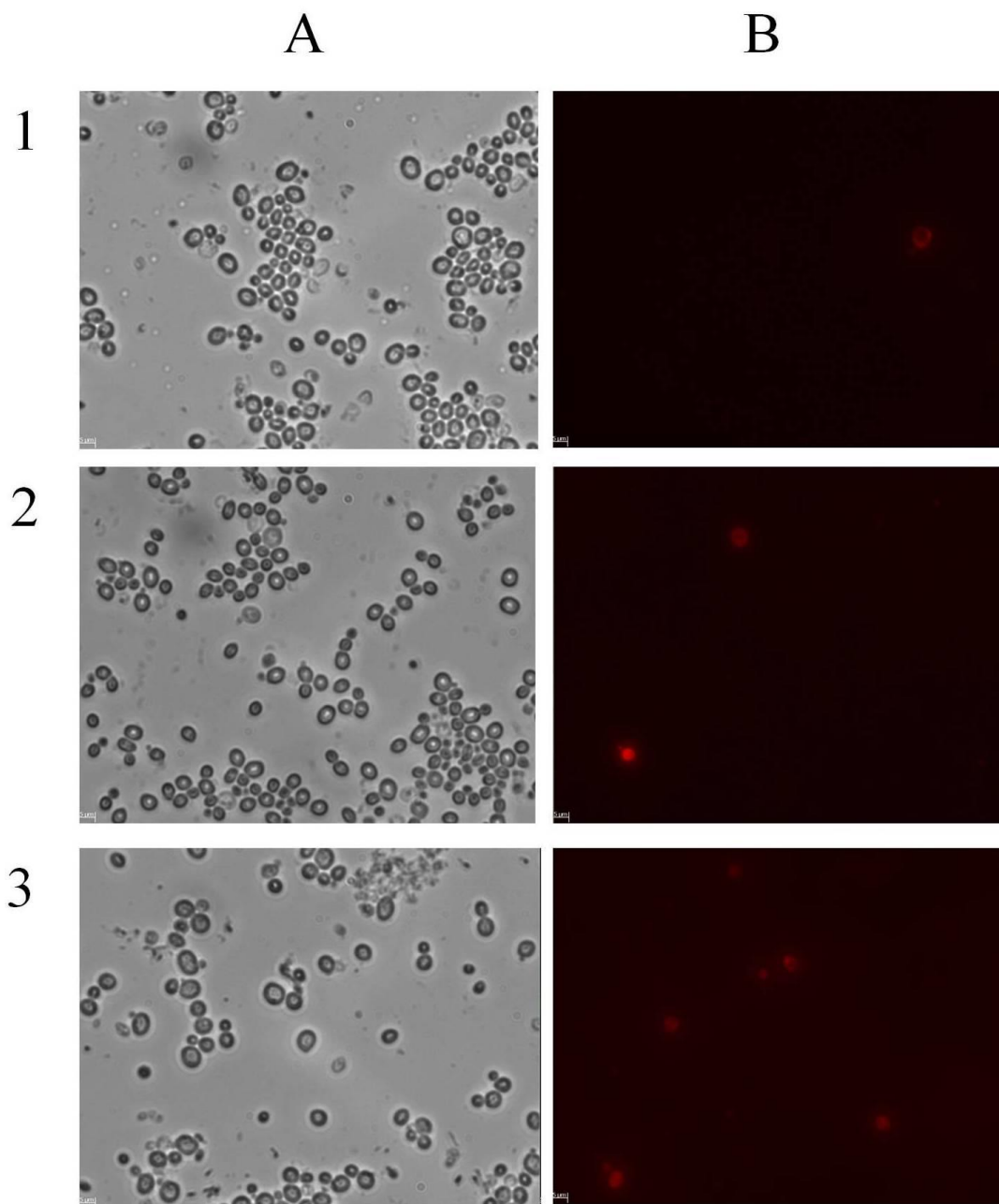


Figura 21 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem *trk1Δ*. A coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etídio. Na linha (1) Controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

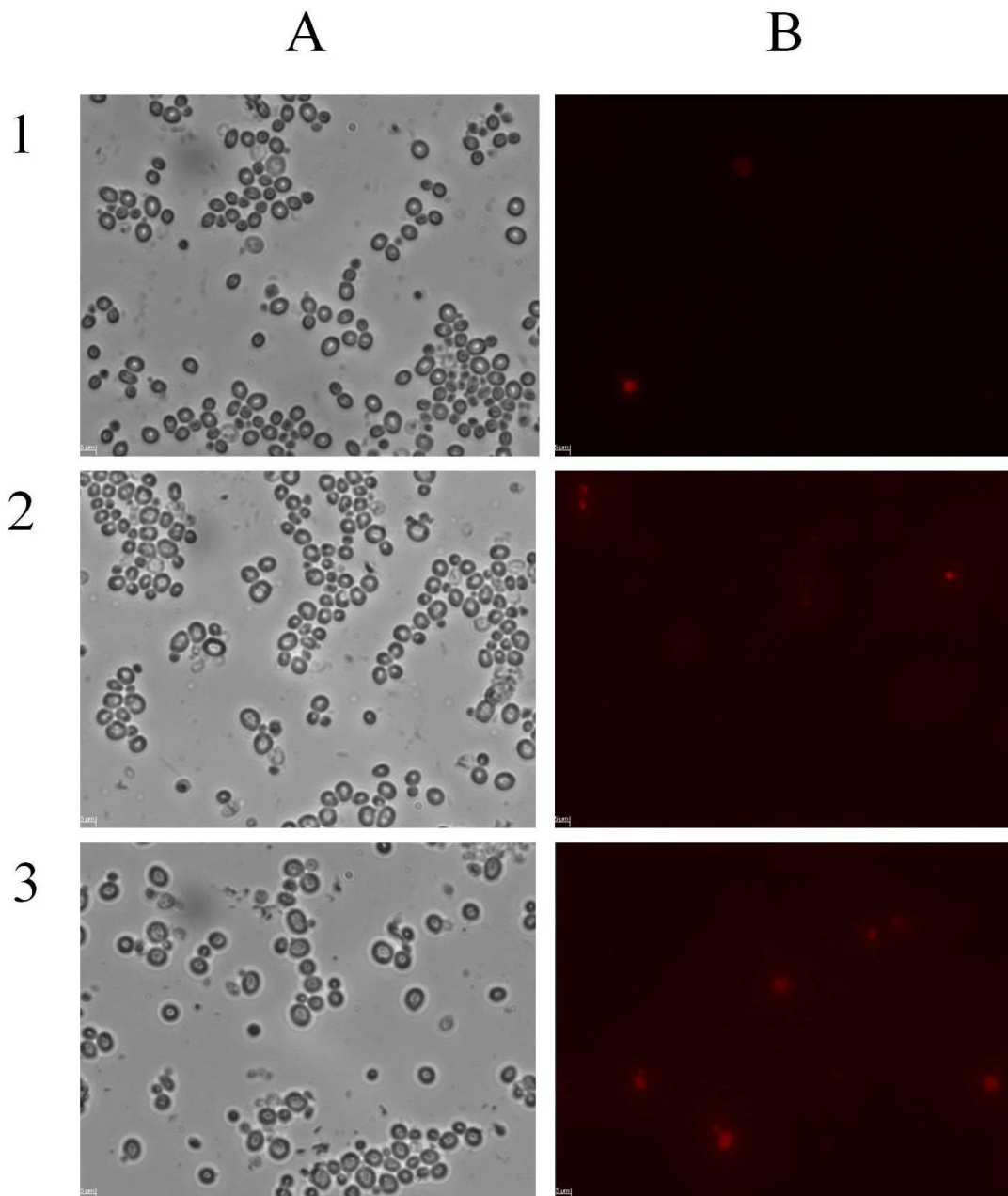


Figura 22 - Análise da viabilidade da membrana utilizando brometo de etídio na linhagem *trk2Δ*. A coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etídio. Na linha (1) controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

5.2.2 – Avaliação de células metabolicamente ativas com o uso do corante floxina

A formação de colônias em placas fornece informação sobre a capacidade de realizar a divisão celular. Porém por meio deste teste, não se pode avaliar se a célula encontra-se viável ou não, já que a célula mesmo não sendo capaz de se dividir pode estar metabolicamente ativa (ROUX *et al.*, 2006). Por esta razão optamos por expor as células a um corante capaz de distinguir quais as células estão viáveis metabolicamente. A floxina B é um marcador capaz de penetrar na célula de forma passiva e então é excretada pelas células que estão metabolicamente ativas, assim as células que se apresentam coradas estão mortas. Presumivelmente este corante é excluído das células vivas graças à semi permeabilidade da membrana plasmática (ROONGRUANGSREE *et al.*, 1988; SUZUKI *et al.*, 2011)

Após incubação durante 24 horas com as concentrações de 0,5 mM e 4 mM de cloreto de cádmio, observamos que todas as linhagens (*BY4741-WT*, *tps1Δ*, *ahp1Δ*, *trk1Δ* e *trk2Δ*), apresentaram menos de 10% coradas com floxina B, ou seja, menos de 10% estavam mortas. Aparentemente a linhagem *ahp1Δ* apresentou uma maior proporção de células coradas (figura 23), estes resultados estão de acordo com o resultado obtidos em placas (figura 16).

Assim, de acordo com os resultados apresentados na figura 23, é possível observar que a porcentagem de células mortas durante a incubação de 24 horas em presença de 0,5 mM e 4 mM de CdCl₂ foi baixa, abaixo de 10%. Por esta razão, consideramos que nas condições experimentais usadas as células não são capazes de se dividirem quando colocadas em placas suplementadas com as mesmas concentrações de CdCl₂ (vide figura 16), porém estão metabolicamente ativas quando esta avaliação é realizada tanto por meio do uso de floxina B (figura 23), quanto pelo uso do brometo de etídio (figura 17).

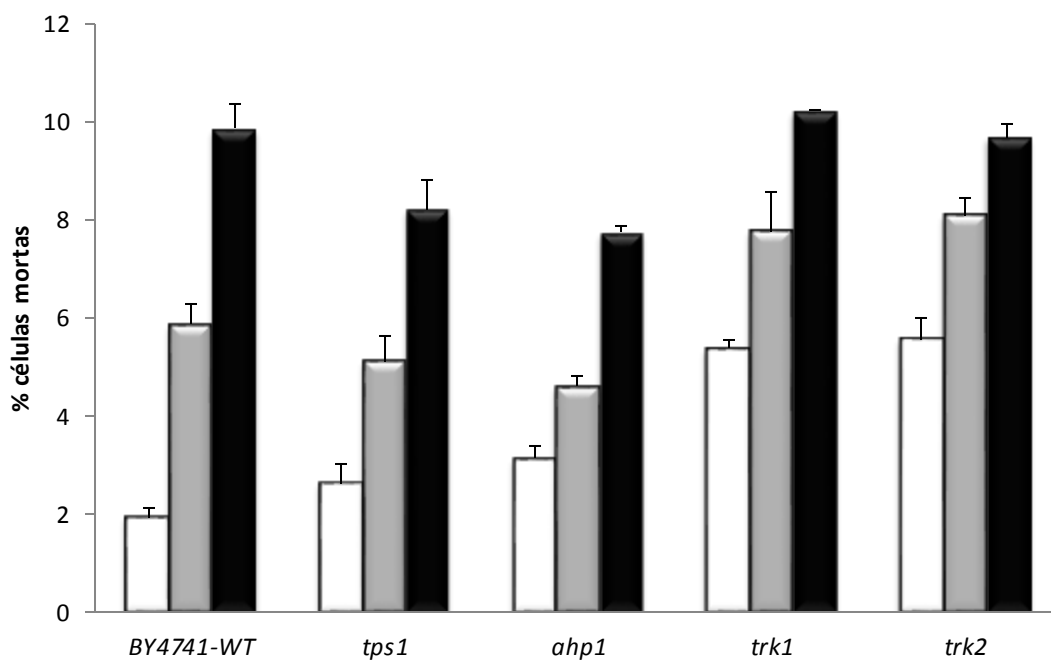


Figura 23 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B nas linhagens *BY4741-WT*, *tps1* Δ , *ahp1* Δ , *trk1* Δ e *trk2* Δ □ Controle, ■ 0,5 mM e ■ 4 mM. As células foram incubadas com CdCl₂ durante 24 horas e posteriormente incubadas com floxina B. Os resultados foram expressos na forma de porcentagem.

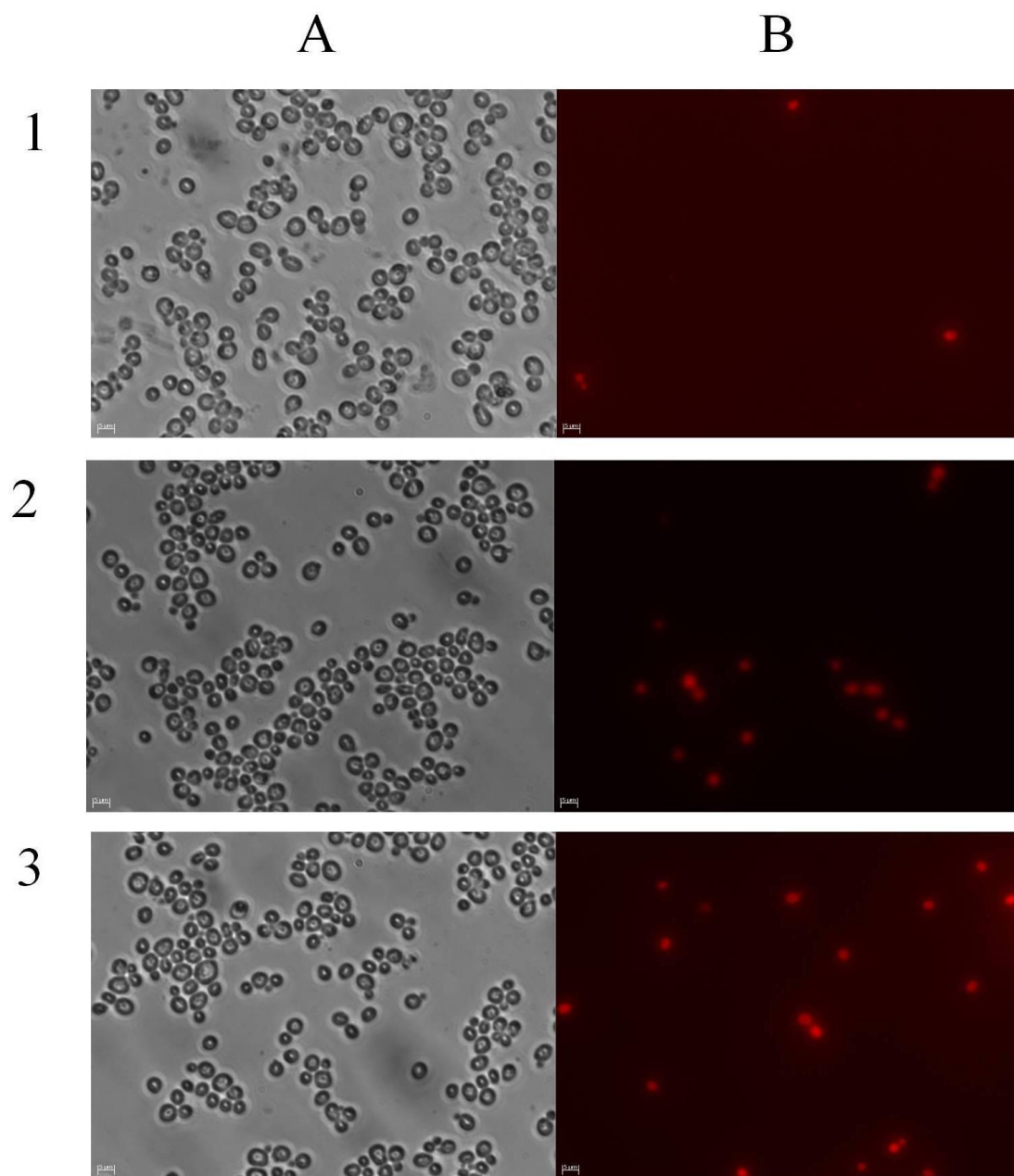


Figura 24 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem *BY4741-WT*. Coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etdio. Na linha (1) Controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

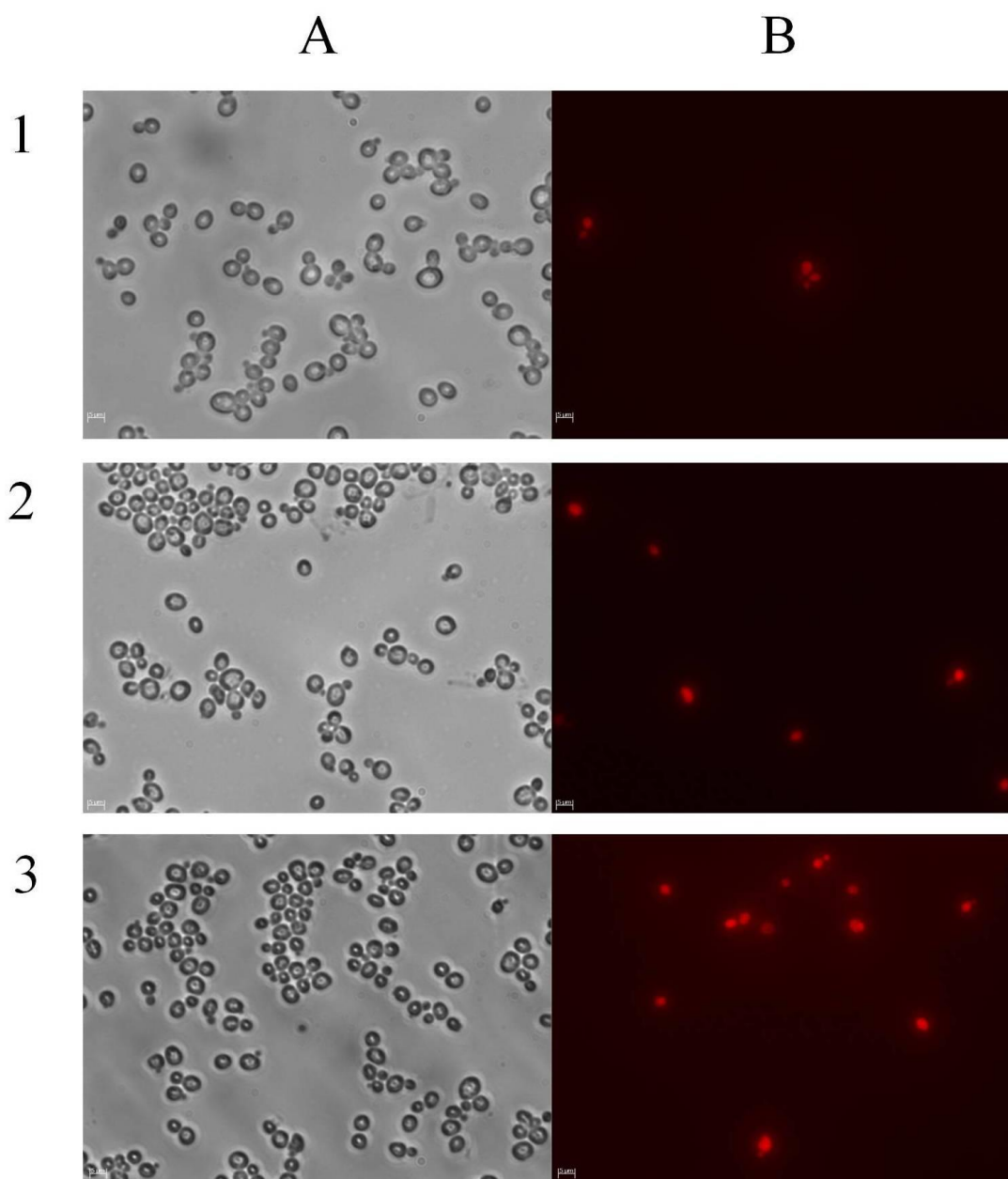


Figura 25 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem *tps1Δ*. Coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etídio. Na linha (1) Controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

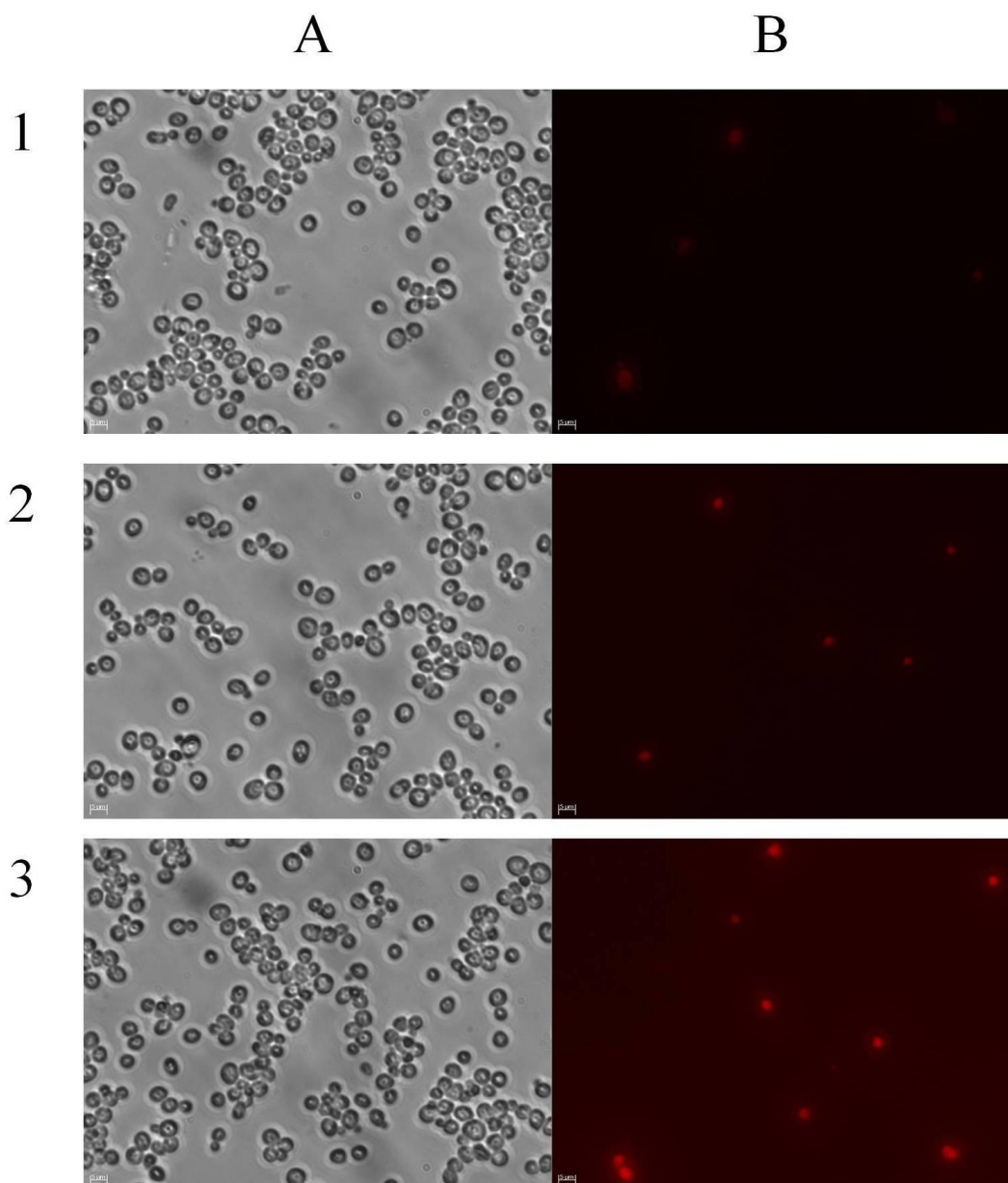


Figura 26 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem *ahp1Δ*. Coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etídio. Na linha (1) Controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

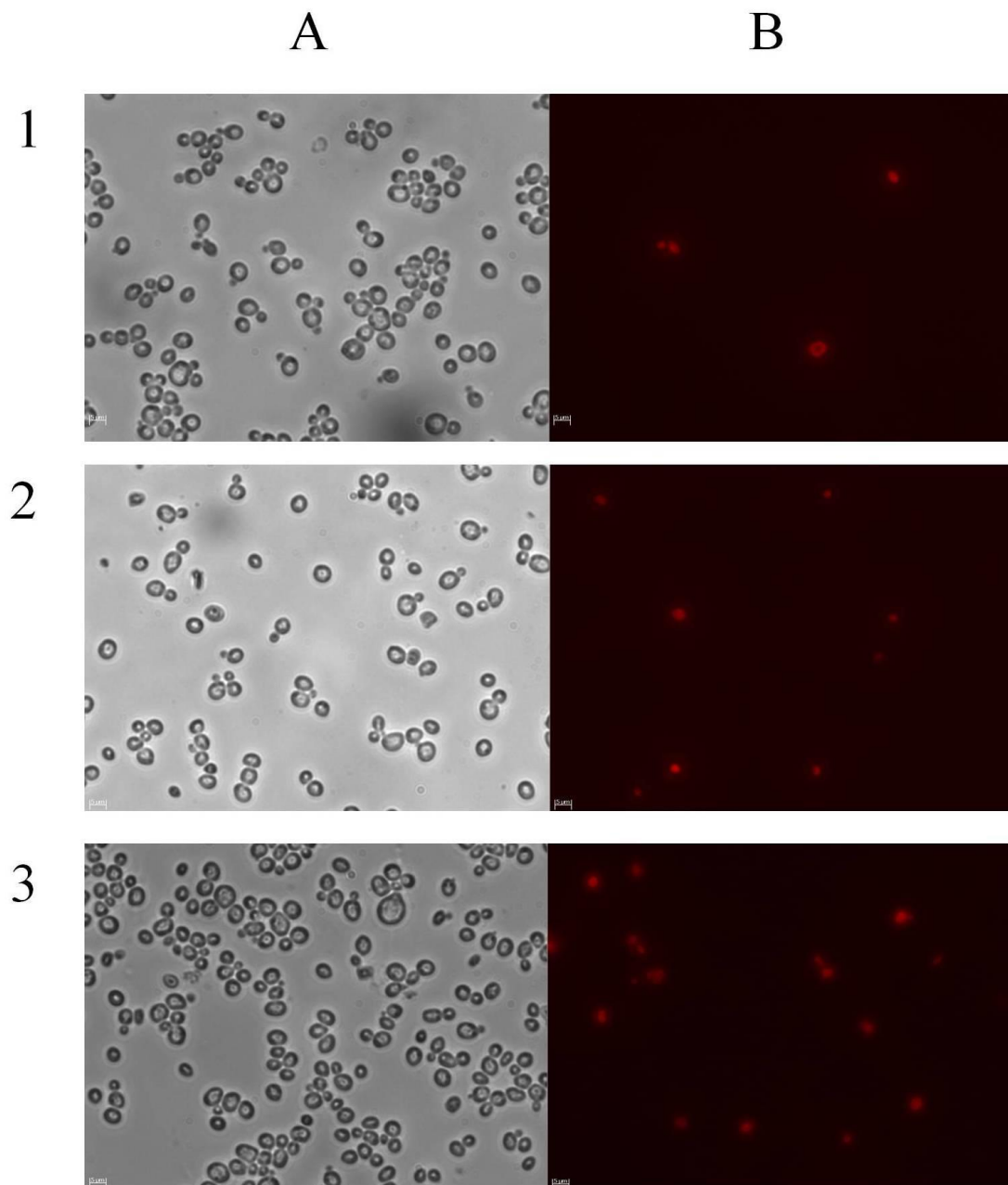


Figura 27 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem *trk1Δ*. Coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etídio. Na linha (1) Controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

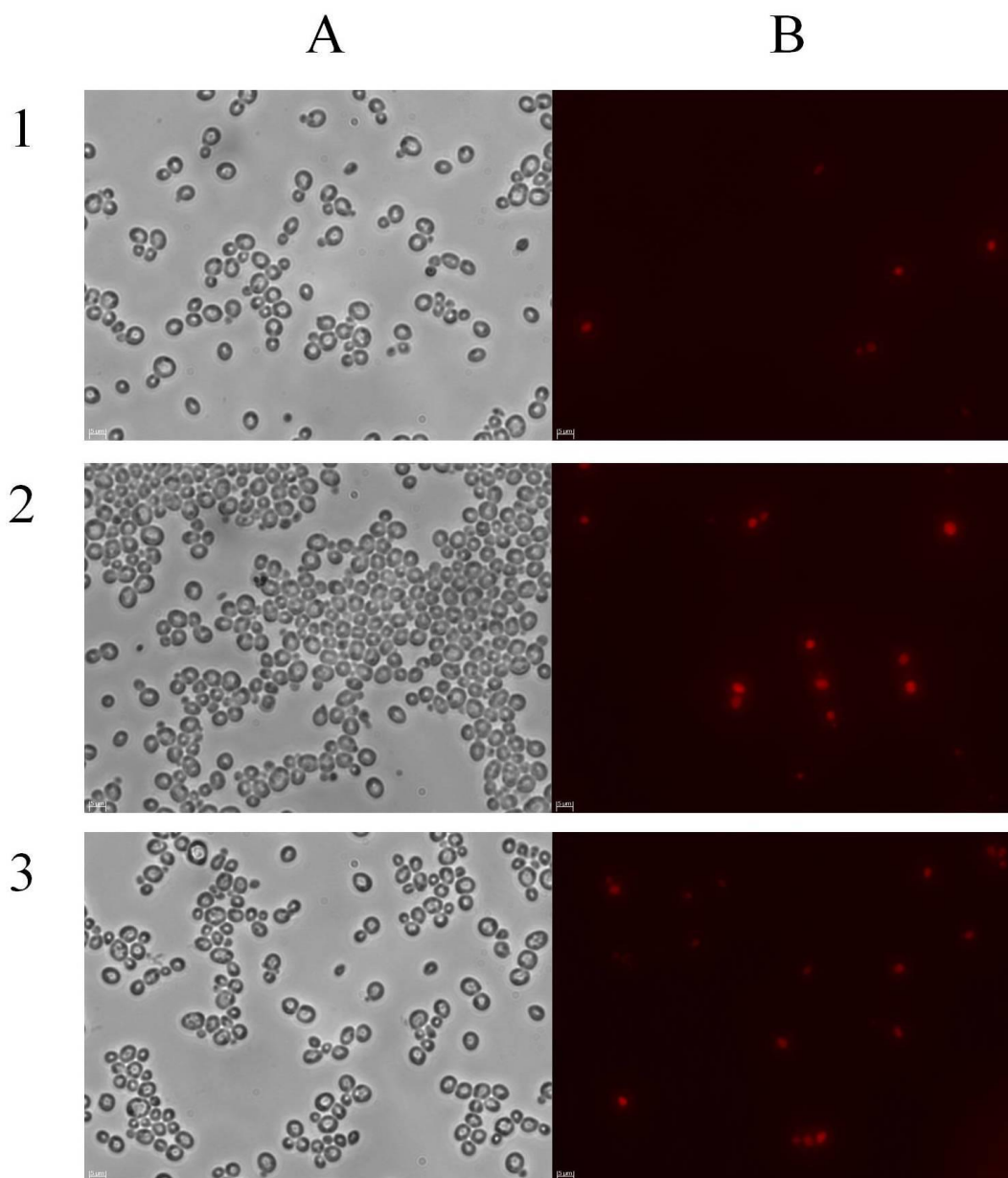


Figura 28 - Análise da viabilidade celular utilizando floxina B na linhagem *trk2Δ*. Coluna (A) Campo Claro e (B) Brometo de Etídio. Na linha (1) Controle (2) 0,5 mM de CdCl₂ e (3) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

5.3 - Incorporação de cádmio

Após análise da tolerância das diferentes linhagens à exposição ao cádmio, foi verificado a capacidade das diferentes linhagens em incorporar Cd^{2+} após a suplementação do meio líquido com CdCl_2 . A quantidade de cádmio determinada na célula foi correlacionada com a ausência de cada um dos genes em estudo.

Em estudo anterior deste laboratório (Costa-Moreira, 2007) foi determinado a influência da fase de crescimento da célula (logarítmica ou estacionária) quando exposta ao cádmio e a quantidade de metal incorporado pelas células. Estes resultados mostraram que células coletadas em fase logarítmica de crescimento incorporavam mais cádmio quando comparadas com células coletadas em fase estacionária. Esta maior incorporação se deve ao fato das células estarem metabolicamente ativas e com metabolismo acelerado. Assim, todos os experimentos deste trabalho foram realizados usando células coletadas nesta fase de crescimento.

A levedura *S. cerevisiae*, como os demais organismos vivos, não apresenta o elemento Cd^{2+} na sua composição fisiológica, este metal só pode ser detectado como resultado de contaminação. Razão pela qual, na situação controle (ausência de cádmio), este elemento não pode ser determinado (Tabela 3). A presença de cádmio exógeno, suplementado ao meio, leva a sua incorporação. Em geral, quanto maior a concentração extracelular do cádmio, maior a incorporação, embora esta não seja diretamente proporcional à concentração (COSTA-MOREIRA *et al.*, 2007).

Na presença de 0,5 mM de CdCl_2 todas as linhagens incorporam o metal (Tabela 3). De maneira geral, na presença de 4 mM de CdCl_2 no meio extracelular, houve uma maior incorporação de cádmio em todas as linhagens testadas se comparadas com as incorporações determinadas quando a concentração usada foi 0,5 mM de CdCl_2 . Comparando-se a incorporação da linhagem *BY4741-WT* com aquela determinada nas linhagens *tps1Δ* e *ahp1Δ*, observou-se uma diminuição significativa de 19% e 25% respectivamente, na incorporação do Cd^{2+} , quando comparada com a linhagem controle após incubação com 0,5 mM (*BY4741-WT*).

No tabela 3, observou-se que a linhagem que não pode sintetizar trealose (*tps1Δ*) apresentou uma queda na incorporação de Cd^{2+} de 39%, comparada com a incorporação obtidas pelas células da linhagem *BY4741-WT* na presença de 4 mM. Este resultado mostra que a trealose de alguma forma participa da incorporação de cádmio, pois células da linhagem que não pode sintetizar este carboidrato mostraram uma menor incorporação do metal.

O metabolismo de açúcar e de carboidratos de reserva em *S. cerevisiae* é intimamente conectado e regulado pela presença de trealose. O gene *TPS1* participa do influxo de glicose na célula (VAN AEIST *et al.*, 1993), fato que implica no papel regulatório da proteína *tps1p* na resposta ao estresse. Entretanto, sua conexão com a homeostase iônica e cátions tóxicos tem sido pouco investigada. Nossos resultados indicam que existe uma menor incorporação de Cd^{2+} pela linhagem *tps1Δ* quando comparada à linhagem *BY4741-WT*.

Martínez-Esparza e colaboradores (2007) usando mutante que apresenta deleção do gene que codifica a enzima trealose-6-fosfato sintase (*tps1*) na levedura *Candida albicans*, observou a existência de modificações estruturais e/ou químicas na parede celular destas células. Da mesma forma, é possível considerar que tais alterações também possam ocorrer na linhagem *tps1Δ* de *S. cerevisiae*, de modo a dificultar a incorporação de cádmio, ou ainda que exista uma diminuição do transporte deste metal para o interior das células. Situações estas que podem justificar a diminuição da incorporação do cádmio pela mutante *tps1*.

A linhagem *ahp1Δ* (com ausência da enzima alkil hidroperoxidase redutase), mostrou diferença na incorporação de cádmio, quando comparada com a *BY4741-WT*, apenas na concentração de 0,5mM. Trabalho realizado por Farcanasu e colaboradores (1999) mostrou que a mutação *ahp1Δ* na levedura *S. cerevisiae* resultou em problemas na regulação dos níveis citosólicos de Mn^{2+} e no transporte deste íon. Por outro lado, trabalhos realizados por Liu e colaboradores (1997) e Reddi e colaboradores (2009) mostraram que o transportador de alta afinidade de Mn^{2+} participa do influxo de Cd^{2+} . Nossos resultados mostraram que na concentração de 0,5 mM de cádmio o mutante *ahp1* incorporou 19% menos do que a linhagem controle (*BY4741-WT*). Enquanto na concentração de 4mM não foi verificado diferença na incorporação. Provavelmente este

transportador de Mn^{2+} pode ser usado pela linhagem *ahp1Δ* como um transportador de baixa afinidade de Cd^{2+} .

Observou-se ainda que os mutantes do sistema de transporte de potássio, *trk1/trk2* não apresentaram nenhuma alteração na incorporação de cádmio quando comparada à linhagem *WT*, usada em todos os experimentos como linhagem controle. A ideia inicial ao escolhermos as linhagens *trk1Δ* e *trk2Δ* foi verificar se o sistema de transporte de potássio participaria de forma ativa na incorporação de cádmio, uma vez que a literatura demonstra que a incorporação de metais como cobre, cobalto e cádmio levam a uma perda de potássio (BRADY & DUNCAN, 1994). Aparentemente, quando existe a entrada no interior da célula de cátions $2+$, como os acima citados, é necessário a saída de potássio para a manutenção da homeostase iônica. Nosso raciocínio foi verificar se na ausência destes transportadores, poderia haver uma menor incorporação de cádmio. Entretanto, os resultados aqui obtidos demonstraram que a deleção de um dos dois genes responsáveis pelo transporte de potássio não tem qualquer influência, não levando à diferenças na incorporação de cádmio comparada à incorporação verificada na linhagem *BY4741-WT*.

Tabela 3 - Incorporação de cádmio após 24 horas por diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

Linagem	0,5 mM de CdCl ₂ (µg Cd/g peso seco de célula)	4 mM de CdCl ₂ (µg Cd/g peso seco de célula)
<i>BY4741</i>	2300 ± 0	24000 ± 2000 ^(a)
<i>tps1Δ</i>	1866 ± 57 ^(b)	14666 ± 577 ^(a,c)
<i>ahp1Δ</i>	1733 ± 152 ^(b)	24000 ± 2000 ^(a)
<i>trk1Δ</i>	1866 ± 321	26000 ± 0 ^(a)
<i>trk2Δ</i>	2500 ± 200	22333 ± 2828 ^(a)

Os resultados são as médias de experimentos realizados em triplicada.

Letras representam diferença significativa entre as amostras (p>0,05):

a – diferença significativa em relação incubação com 0,5 mM CdCl₂;

b – diferença significativa em relação à linhagem *WT* após incubação com 0,5 mM CdCl₂;

c – diferença significativa em relação à linhagem *WT* após incubação com 4 mM de CdCl₂

5.4 - Determinação do íon potássio após incorporação de cádmio

A homeostase iônica é de fundamental importância para a manutenção dos principais mecanismos fisiológicos e, conseqüentemente, para a viabilidade celular. As concentrações de H^+ , Ca^+ , K^+ e Na^+ são altamente reguladas. Os íons Na^+ e K^+ estão envolvidos em importantes processos e atividades em sistemas celulares, enquanto altas concentrações de Na^+ são tóxicas para a célula (RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2000; ARIÑO *et al.*, 2010).

O potássio é o cátion mais abundante em *S. cerevisiae*, e está envolvido em várias funções celulares tais como: regulação de volume celular e pH intracelular, manutenção do potencial através da membrana plasmática, compensação de cargas negativas presentes em várias macromoléculas, síntese de proteína e ativação de enzimas (SYCHROVÁ, 2004; YENUSH *et al.*, 2005; ARIÑO *et al.*, 2010). A concentração de K^+ no citoplasma é de aproximadamente 200-300 mM, dependendo da linhagem e das condições de crescimento (NAVARRETE *et al.*, 2010).

A manutenção desta alta concentração de K^+ intracelular é feita graças ao transporte de K^+ que ocorre contra um gradiente de concentração. Existem vários sistemas envolvidos na translocação do K^+ celular, incluindo: transporte ativo via permeases, co-transporte com prótons via H^+ -ATPase e transporte passivo de K^+ via canais iônicos. Os transportadores de K^+ além do influxo, também participam do efluxo de K^+ . A concentração intracelular de K^+ resultante se deve ao balanço entre o influxo e efluxo (WALKER, 1998).

Analisando os resultados apresentados na tabela 4, observou-se que existiu uma saída ou, perda de potássio (efluxo) à medida que as células incorporaram Cd^{2+} . Todas as linhagens estudadas (*BY4741-WT*, *tps1Δ*, *ahp1Δ*, *trk1Δ* e *trk2Δ*) perderam K^+ de forma significativa após a incorporação do cádmio. No entanto, essa perda não foi diretamente proporcional à quantidade de cádmio incorporado. Possivelmente, esta diferença pode ser explicada pela síntese diferenciada de canais e transportadores que podem ser usados pelo cádmio (figura 6).

A linhagem *tps1Δ* apresentou a maior perda de potássio após incorporação com 4mM, quando comparada à situação controle (64%) e com todas as linhagens estudadas.

Este resultado é compatível com o observado por Mulet e colaboradores (2004) que observaram ativação dos genes TRK1 e TRK2 pelo gene TPS1, Entretanto, quando comparamos este resultado, com a incorporação de cádmio (tabela 4), observamos que a linhagem *tps1Δ* apresenta a menor incorporação de metal na concentração de 4 mM.

A exposição de *S. cerevisiae* ao Cd²⁺ geralmente resulta na permeabilização da membrana plasmática, que é detectada com uma rápida e não estequiométrica perda de K⁺ celular (HOWLETT & AVERY, 1997). Haddad- Ribeiro (2009) observou o mesmo perfil de perda de potássio em 10 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas da fermentação de cachaça, após a incubação com 0,5 mM de cádmio.

A captação de metais por *S. cerevisiae* é geralmente acompanhada pelo efluxo de K⁺, representando uma parte integral do mecanismo fisiológico para a manutenção do balanço iônico, mas pode ser também um sinal de ruptura da membrana e morte celular (SUH *et al.*, 1999). Os transportadores de K⁺ podem transportar íons monovalentes (Rb⁺, Cs⁺, Li⁺, NH₄⁺) e divalentes (Ca⁺² e Mg⁺²) (BORST-PAUWELS, 1981).

Vários fatores físicos e químicos podem induzir o efluxo de K⁺ de leveduras, por exemplo: corante catiônicos, desacopladores, metais, detergentes, nistatina e toxinas *killer* (WALKER, 1998). Por outro lado, tem sido amplamente reportado em *S. cerevisiae* que cádmio e cobre, induzem a permeabilização da membrana plasmática, levando ao efluxo de K⁺ (HOWLETT & AVERY, 1997).

Os resultados obtidos indicam que a quantidade de K⁺ presente nas células é variável e depende da linhagem usada. A linhagem *tps1Δ* apresentou, na situação controle (ausência de cádmio), 15% a mais de K⁺ quando comparada com a linhagem controle (*BY4741-WT*) na mesma situação. Após o tratamento com 0,5 mM a célula apresentou também diferença na concentração de K⁺, com um aumento de 15% quando comparada a linhagem *WT* na mesma concentração de metal. Após o tratamento de 4 mM não houve diferença significativa nos níveis de K⁺.

Na ausência de Cd²⁺ (situação controle) a linhagem *ahp1Δ* apresentou 14% a mais na quantidade de potássio que a linhagem *BY4741-WT*. E mesmo após a incubação com CdCl₂, as células apresentaram maior concentrações de K⁺ quando comparadas a linhagem *WT*. Na comparação com a linhagem *WT*, as células com deleção do gene

AHP1 quando incubadas com 0,5 mM e 4 mM apresentaram aumento de 15% e 24% na quantidade de K^+ determinada.

Em comparação com a linhagem *WT*, a quantidade de potássio não foi alterada após a incorporação de Cd^{2+} nas linhagens *trk1Δ* e *trk2Δ*, linhagens que apresentam deleção dos genes responsáveis pelo transporte de potássio (tabela 4). Os valores obtidos foram semelhantes tanto na ausência, como após a incorporação de 0,5 mM e 4 mM de cádmio. Resultado semelhante foi obtido por Navarrete e colaboradores (2010) que também não observaram diferença na quantidade de potássio nas células de *S. cerevisiae trk1Δ* e *trk2Δ* quando comparadas à linhagem *BY4741-WT*.

Tabela 4 - Determinação de potássio em diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

Linhagem	Controle ($\mu\text{g K}^+$/g de peso seco)	0,5mM de CdCl₂ ($\mu\text{g K}^+$/g de peso seco)	4mM de CdCl₂ ($\mu\text{g K}^+$/g de peso seco)
<i>BY4741</i>	16433 \pm 550	14633 \pm 550 ^(a)	7766 \pm 208 ^(a)
<i>tps1Δ</i>	19200 \pm 100 ^(b)	17200 \pm 500 ^(a, c)	6933 \pm 416 ^(a, d)
<i>ahp1Δ</i>	19000 \pm 200 ^(b)	16900 \pm 556 ^(a, b)	10100 \pm 707 ^(a, d)
<i>trk1Δ</i>	17033 \pm 680	15333 \pm 305 ^(a)	7350 \pm 212 ^(a)
<i>trk2Δ</i>	17466 \pm 57	15733 \pm 635 ^(a)	8500 \pm 264 ^(a)

Os resultados são as médias de experimentos realizados em triplicada. Letras representam diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Letras representam diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$):

a – diferença significativa em relação a situação controle (ausência de CdCl₂);

b – diferença significativa em relação à linhagem *WT* na situação controle;

c – diferença significativa em relação à linhagem *WT* após incubação com 0,5 mM CdCl₂;

d – diferença significativa em relação à linhagem *WT* após incubação com 4 mM de CdCl₂

5.5 - Determinação da velocidade de captação de ^{109}Cd

O mutante *tps1Δ* apresentou uma menor incorporação de Cd^{2+} quando comparado à incorporação verificada na outras linhagens usadas (tabela 3), este resultado sugeriu a possibilidade de incorporação diferenciada de cádmio pelo mutante *tps1Δ*. Assim, decidimos verificar se havia diferença na velocidade de incorporação do metal, para tanto foi usado o transporte de ^{109}Cd pelas células. O resultado está apresentado na tabela 5. Observa-se que, nas primeiras 6 h, o mutante apresentou a velocidade de incorporação diminuída em 13% quando comparada a linhagem selvagem. Exposições em intervalos de tempos maiores evidenciaram a significativa diminuição na velocidade de incorporação nas duas linhagens, porém, o fenômeno é muito mais acentuado na linhagem mutante. Estes resultados indicam que a sugestão inicial: possível diferença no transporte de cádmio entre a linhagem selvagem e mutante *tps1Δ* se confirmou, a linhagem que não apresenta o gene *tps1Δ* apresentou menor velocidade de incorporação de cádmio.

Tabela 5 - Velocidade de incorporação ^{109}Cd (cpm/hora/ 2×10^8 cel/mL) nas linhagens *S. cerevisiae* *BY4741-WT* e *S. cerevisiae* *tps1Δ*.

Tempo (horas)	Linhagem <i>BY4741-WT</i>	Linhagem <i>tps1Δ</i>
0 – 6	1024,5	892,0
6 – 12	891,5	408,1
12 – 18	199,6	350,0
18 - 24	214,3	51,8

Os resultados são as médias de experimentos realizados em triplicada.

5.6 - Determinação da peroxidação de lipídios

Um dos principais alvos dos radicais livres formados durante o estresse oxidativo são os ácidos graxos poli insaturados (PUFA – *Poly Unsaturated Fat Acid*) que compõem a bicamada lipídica das membranas celulares (VALKO *et al.*, 2005). Os peróxidos de lipídios formados causam grandes prejuízos ao organismo, pois promovem alterações na capacidade seletiva das membranas, favorecendo a entrada e a saída indiscriminada de metabólitos e detritos da célula, fato este frequentemente associado à morte celular (PEREIRA *et al.*, 2003). É importante mencionar que a manutenção da integridade da membrana citoplasmática, ou das organelas, é vital para o funcionamento celular.

A quantidade de peróxidos lipídicos formada foi determinada de acordo com a quantidade de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação. Cada molécula de MDA reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, formando uma substância cromófora que é passível de ser determinada espectrofotometricamente (ESTEUBAUERS *et al.*, 1991)

Analisando os resultados na figura 29, observou-se que a linhagem *BY4741-WT*, na concentração de 0,5mM de cádmio, apresentou uma queda de 32% nos danos aos lipídeos quando comparada com a ausência do cádmio. Possivelmente, esta concentração de cádmio permitiu a indução da resposta antioxidante e como consequência, uma menor extensão de danos foi verificada. Este resultado está em concordância com Liu e colaboradores (2005), que observaram que a exposição da levedura *S. cerevisiae* ao cádmio induz ativação das defesas antioxidantes com aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) e também aumento de metalotioneína. Quando incubado com 4 mM de CdCl₂ foi observado um aumento de 74% nos danos aos lipídeos comparados com a situação controle. Possivelmente, a alta concentração de cádmio usada não pode ser contrabalanceada pelo aumento nas defesas antioxidantes, e o dano oxidativo (peroxidação lipídica) é observado com toda intensidade.

A linhagem *tps1Δ* após a incubação com CdCl₂ apresenta aumento na quantidade de lipídeos peroxidados. Após incubação com 0,5 mM e 4 mM de cloreto de cádmio, a célula sofreu um aumento de 46% e praticamente 200% de lipídeos

peroxidados, respectivamente, quando comparados com a situação de ausência do metal. Este resultado indica que a ausência da trealose causou um aumento nos danos lipídicos e demonstra o importante papel protetor da trealose aos lipídeos.

Outro ponto importante a ser destacado na linhagem *tps1Δ* é que ela apresenta um aumento de 73% nos lipídeos peroxidados quando comparada à linhagem *BY4741-WT* (linhagem controle) na ausência de metal, ou seja, sem qualquer estresse induzido. E apresenta também um aumento de 70% e 194% nos danos lipídicos, após a incubação com 0,5mM e 4 mM de Cd^{2+} , respectivamente, quando comparado as mesmas concentrações da linhagem *BY4741-WT*. Assim, ressaltamos que a linhagem *tps1* incorporou menos Cd^{2+} (Tabela 3) que a linhagem controle, porém mesmo com uma menor incorporação de Cd^{2+} , os danos aos lipídeos foram maiores.

De acordo com dados da literatura, a trealose tem o papel de estabilizar membranas durante exposição ao estresse oxidativo (HERDEIRO *et al.*, 2006). Estudos realizados por Pereira e colaboradores (2003) mostraram que sob condições de desidratação, a tolerância das leveduras é altamente influenciada pela presença de trealose, que em muitos casos protege a membrana plasmática contra os danos. Oku e colaboradores (2003) demonstraram em estudos *in vitro* que, parte da molécula de trealose, interage especificamente com uma dupla ligação cis de um ácido graxo insaturado, por meio da formação de ponte de hidrogênio entre grupos hidroxilas OH-6 e OH-3 ou OH-2 com a trealose.

A linhagem *ahp1Δ*, quando incubada com 0,5 mM de cloreto de cádmio, apresentou uma queda de 15% nos danos aos lipídeos, comparada com a incubação sem o metal. Entretanto, quando incubada à concentração de 4 mM de cádmio, a linhagem sofreu 39% mais danos aos lipídeos do que com a incubação na ausência de cádmio.

Os resultados da linhagem *ahp1Δ* mostraram aumento na quantidade de lipídeos peroxidados quando comparados à linhagem controle (*BY4741-WT*). Na situação controle, ausência de metal, a linhagem *ahp1Δ* apresentou um aumento de 3 vezes na quantidade de lipídeos peroxidados comparados na mesma situação com a linhagem *WT*. Após a incubação com cádmio, nas concentrações de 0,5mM e 4mM houve aumento nos danos lipídicos de 3,6 e 2,3 vezes, respectivamente, quando comparadas a linhagem *BY4741-WT*. Este resultado sugere que a alquil hidroperoxidase está

relacionada à proteção dos lipídeos contra o estresse oxidativo induzido pelo cádmio. De acordo com a literatura, a alkil hidroperoxidase redutase está associada com a membrana plasmática (DELOM *et al.*, 2006). Da mesma forma, em estudos com membrana plasmática, observou-se a associação direta entre tioredoxinas à fração insolúvel das membranas das células (TAKEUCHI *et al.*, 2007).

Assim, observamos que apesar das células *ahp1Δ*, na ausência de cádmio (situação controle), apresentarem intensa peroxidação lipídica, a resposta induzida pela presença de cádmio foi semelhante à resposta observada na linhagem *BY4741-WT*. Por outro lado, recordamos que a ausência do gene *AHP1* pareceu implicar em uma menor formação de colônias em presença de 0,125 mM de Cd^{2+} (Figura 16). Estes fatos nos levaram a considerar que possivelmente, a enzima *ahp1p* esteja de alguma forma, relacionada ao fenótipo de sensibilidade ao cádmio, mas, não é determinante para a indução da resposta expressa na amenização dos danos oxidativos causados pela presença de cádmio. Este papel parece ser desempenhado pela trealose, evidenciado pelo resultado da tolerância em placas (figura 16) menor incorporação de metal (tabela 3) maior perda de K^+ (tabela 4). Outro aspecto a ser destacado é que não parece existir ligação entre peroxidação lipídica e perda de potássio intracelular, ao contrário do que sugere o trabalho realizado por Howlett & Avery (1997). A linhagem *ahp1Δ* apresenta muito mais lipídeo peroxidado e maior concentração de potássio intracelular quando comparada à linhagem *BY4741-WT*.

As linhagens do sistema de transporte de potássio (*trk1/trk2*), apresentaram um perfil de danos lipídicos semelhante a linhagem controle (*BY4741-WT*). Não apresentaram alterações na quantidade de lipídeos danificados em nenhuma das situações estudadas (controle, 0,5mM e 4mM) quando comparadas à linhagem *BY4741-WT*. Quando analisado a peroxidação de lipídeos após a incorporação de 0,5mM do metal, observa-se que a linhagem *trk1* e a linhagem *trk2*, apresentaram uma diminuição de 17% e 22% nos lipídeos peroxidados, enquanto que na concentração de 4 mM ambas as linhagens apresentaram aumento de 35% vezes dos danos aos lipídeos. Como descrito anteriormente, a célula respondeu ao estresse ativando as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, assim, após a incorporação de 0,5 mM de cádmio a célula induziu aumento da resposta antioxidante e uma maior proteção aos danos lipídicos (LI *et al.*, 2005).

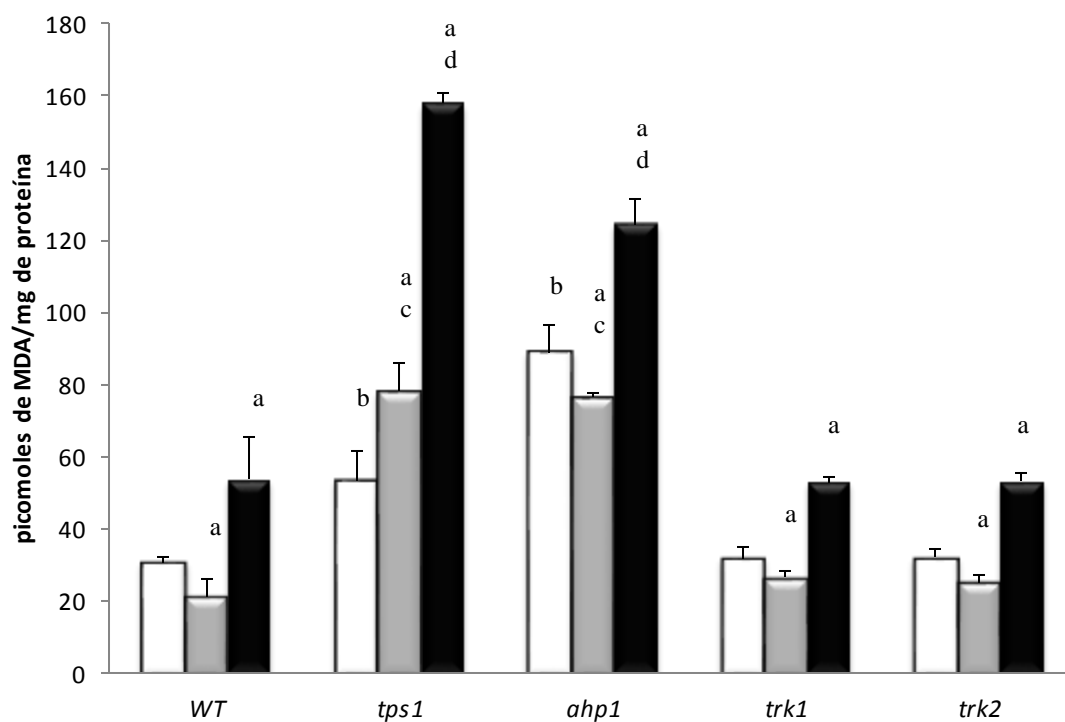


Figura 29 - Determinação da quantidade de lipídeos peroxidados após 24 horas de incubação com CdCl₂ em linhagens *S. cerevisiae*. □ Controle, ■ 0,5 mM e ■ 4 mM. Os resultados são médias de experimentos realizados em triplicata.

Letras representam diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$):

- a – diferença significativa em relação a situação controle (ausência de CdCl₂);
- b – diferença significativa em relação à linhagem *WT* na situação controle;
- c – diferença significativa em relação à linhagem *WT* após incubação com 0,5 mM CdCl₂;
- d – diferença significativa em relação à linhagem *WT* após incubação com 4 mM de CdCl₂

5.7 - Resíduos sulfidrílicos

Os resíduos sulfidrílicos são representados principalmente pelos resíduos SH encontrados na cisteína da glutathione, são abundantes em células e podem ser oxidados pelas espécies reativas de oxigênio, podendo ser utilizados como indicadores de estresse oxidativo (DEMASI *et al.*, 2006). De fato, um dos mecanismos da toxicidade ao cádmio em leveduras é sua ligação às proteínas, resultando na inibição de enzimas essenciais. O cádmio tem afinidade pelo grupo tiol, o que resulta em sua fácil ligação com resíduos de cisteínas em proteínas. Grande parte dos grupamentos sulfidrílicos da célula se refere à presença de glutathione, que pode ser encontrada em concentrações de até 10mM em leveduras. Em *S. cerevisiae* a glutathione (GSH) pode responder por até 1% do peso seco da célula (PENNINCKX & ELSKENS, 1993).

A glutathione oxidada (GSSG) não apresenta grupamentos SH livres, estes só estão presentes quando a glutathione está na forma reduzida (GSH), única forma que apresenta atividade antioxidante. O cádmio pode se ligar aos grupamentos SH de algumas substâncias, como a glutathione, formando o complexo cádmio-glutathione – $Cd(GS)_2$ (BAUDUIN-CORNU *et al.*, 2006). Assim, na presença de ligantes complexados ao grupo SH, os resíduos sulfidrílicos determinados serão menores. O reagente Ellman reage com todos os grupos tiois livres presentes no extrato celular, sendo que o mais abundante resíduo SH livre existente, são aqueles encontrados na forma de glutathione reduzida (DAVIDSON *et al.*, 2001).

De acordo com os resultados apresentados na figura 30, a linhagem *BY4741-WT*, apresentou um aumento de 26% na quantidade de resíduos sulfidrílicos após a incubação com 0,5 mM, quando comparada a situação controle (ausência de metal). Após a incubação com 4 mM apresentou uma queda de 53% na quantidade de resíduos sulfidrílicos quando comparada com a situação controle. O mesmo padrão foi observado nas linhagens *tps1Δ*, *ahp1Δ*, *trk1Δ* e *trk2Δ*, após a incubação com 0,5 mM ocorreu um aumento da quantidade de resíduos e após a incubação com 4 mM ocorreu uma queda.

Vido e colaboradores (2001) analisaram o proteoma de células de *S. cerevisiae* expostas a 1 mM de sal de cádmio, e observaram que 54 proteínas foram induzidas e 43 foram reprimidas. Também observaram que a síntese de glutathione (GSH) foi aumentada várias vezes em resposta ao tratamento com cádmio, assim como proteínas

que fazem parte do sistema de defesa anti-oxidante. Fauchon e colaboradores (2002), também analisaram o proteoma de células de *S. cerevisiae* expostas ao cádmio e observaram o aumento da expressão do gene *GSH1*, responsável pela síntese de glutationa. Lafaye e colaboradores (2005) estudaram o metaboloma de células de *S. cerevisiae* expostas a 50 μM de Cd^{2+} e observaram uma superprodução de GSH em resposta ao tratamento com o metal. Portanto, a presença de glutationa é de grande importância na resposta ao cádmio.

De acordo com trabalho realizado por Brennan (1996), baixas concentrações de cádmio podem aumentar a resistência celular, induzindo o aumento dos mecanismos de defesa. Assim quando as células são incubadas com 0,5 mM de Cd^{2+} , o metal induz um aumento nas defesas antioxidantes não enzimáticas, determinando uma maior concentração de grupamento tióis livres. Porém quando as células são incubadas com 4 mM, elas não conseguiram manter uma resposta antioxidante (não enzimática) suficiente e continuada para responder a esta concentração (4 mM). Desta forma, não observamos a indução das defesas antioxidantes, sendo portanto determinado uma menor concentração de resíduos sulfidrílicos totais. O mesmo efeito de queda na quantidade de resíduos sulfidrílicos foi observada no trabalho realizado por Davidson e colaboradores (2001), onde células de *S. cerevisiae* expostas ao estresse térmico apresentavam uma queda de 50% na quantidade de resíduos.

Observamos ainda que as linhagens *ahp1 Δ* , *trk1 Δ* e *trk2 Δ* , não apresentam diferença nos resíduos sulfidrílicos quando comparadas a linhagem *BY4741-WT* em nenhuma das situações (controle, 0,5 mM e 4 mM).

A linhagem *tps1 Δ* , com deleção no gene responsável pela síntese de trealose, na situação controle, não apresentou diferença na quantidade de resíduos sulfidrílicos quando comparada com a linhagem *WT*. Após a incubação com 0,5mM e 4 mM de cádmio, a linhagem *tps1 Δ* apresentou uma queda de 18% e 62%, respectivamente, nos resíduos sulfidrílicos quando comparada à linhagem *WT*, nas mesmas concentrações (Figura 30). Com esses resultados, pode-se observar que na ausência deste dissacarídeo a célula usou mais seu estoque de glutationa reduzida para se defender dos radicais livres formados, quando comparado com as células que apresentam a trealose. Dessa forma, em células que são incapazes de sintetizar trealose, a glutationa é bastante utilizada, fato que se evidencia na diminuição dos resíduos sulfidrílicos livres.

Estes resultados indicam que na ausência de trealose, a presença de glutathione (neste trabalho representada pela dosagem de grupos SH livres) não é suficiente para realizar a imobilização do Cd^{2+} na forma de bis-glutationato de cádmio (LI *et al.*, 1997) e combater os danos subsequentes às macromoléculas, notadamente o dano oxidativo aos lipídeos das membranas, fato observado pelo aumento dos danos aos lipídeos na linhagem *tps1Δ* (figura 29). O aumento dos resíduos sulfidrílicos observados na linhagem *tps1Δ* a 0,5mM de CdCl_2 deve-se à presença de outros componentes do sistema de defesa antioxidante que são ativados possibilitando com isso o aumento dos resíduos sulfidrílicos celulares.

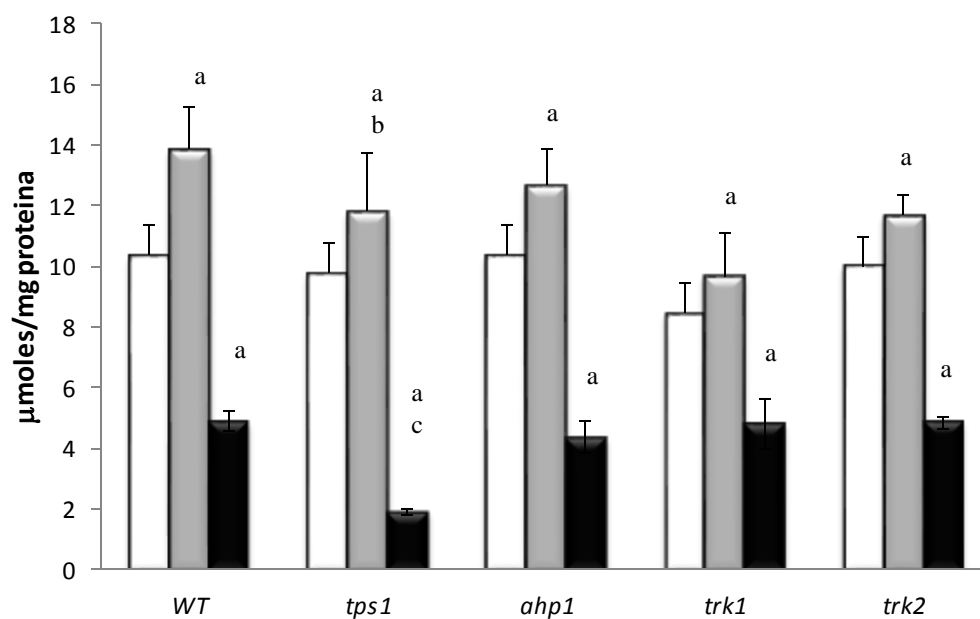


Figura 30 - Determinação da quantidade de resíduos sulfidrílicos totais após 24 horas de incubação com CdCl₂ em linhagens *S. cerevisiae*. □ Controle, ■ 0,5 mM e ■ 4 mM. Os resultados são médias de experimentos realizados em triplicata.

Letras representam diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$):

a – diferença significativa em relação a situação controle (ausência de CdCl₂);

b – diferença significativa em relação à linhagem *WT* após incubação com 0,5 mM CdCl₂;

d – diferença significativa em relação à linhagem *WT* após incubação com 4 mM de CdCl₂

5.8 - Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio

Radicais livres podem ser formados após a exposição de células à radiação ionizante, agentes químicos presentes no meio ambiente e metais. Brennan & Schiestl (1996) mostraram que o cádmio é um gerador de radicais livres em leveduras e, é capaz de desencadear o estresse oxidativo. Células de levedura em crescimento tem capacidade de captar diacetato diclorofluoresceína (DCFHDA) do meio e transportá-la para o citoplasma onde é deacetilada por esterases formando a diclorofluoresceína (DCFH) que fica aprisionada na célula. Uma vez deacetilada, DCFH é susceptível ao ataque de radicais livres, o que resultará na oxidação de DCFH e produção de um composto altamente fluorescente (GOMES *et al.*, 2005). A avaliação da intensidade da fluorescência produzida é considerada uma maneira de visualizar a presença de radicais livres no interior da célula. Nosso objetivo ao usar a diclorofluoresceína (DCFH) como fluoróforo foi avaliar a formação de radicais livres nas diferentes linhagens usadas.

Analisando-se as figuras 31, 33, 34 e 35, na situação controle (ausência de Cd^{2+}) visualizou-se pouca fluorescência. Na a incubação com 0,5mM de CdCl_2 , ocorreu um aumento na fluorescência, e após tratamento com 4 mM de Cl_2 observamos um maior aumento na intensidade da fluorescência.

A fluorescência visualizada na linhagem *tps1* na situação controle (figura 32) é mais evidente que a fluorescência das outras linhagens. Após incubação com CdCl_2 , nas duas concentrações, observamos a intensificação da fluorescência, sendo que na concentração de 4 mM a intensidade foi muito mais acentuada. Este resultado mostrou que, mesmo ausência de qualquer estresse, existiu um aumento na produção e/ou geração de radicais livres nas células da linhagem *tps1Δ*. Lu *et al.*, 2011, em trabalho realizado com *Candida albicans* com deleção no gene TPS1, observou que esta deleção provocou um aumento de 3,2 vezes na geração de radicais livres após incubação com H_2O_2 .

ADAMIS e colaboradores (2003) mostraram que o aumento dos níveis de oxidação intracelular (aumento da presença de ROS) foi diretamente relacionado com as quantidades de cádmio incorporadas pelas células de *S. cerevisiae*. Entretanto, este trabalho observou que as células da linhagem *tps1Δ* incorporaram menos Cd^{2+} quando comparada com as demais linhagens (tabela 3), portanto, a presença de radicais livres

aumentados, tanto na situação controle, como nas tratadas, não tem relação apenas com a quantidade de Cd^{2+} incorporado como reportado por Adamis e colaboradores (2003). A ausência de trealose também foi responsável por uma maior produção de radicais livres na célula.

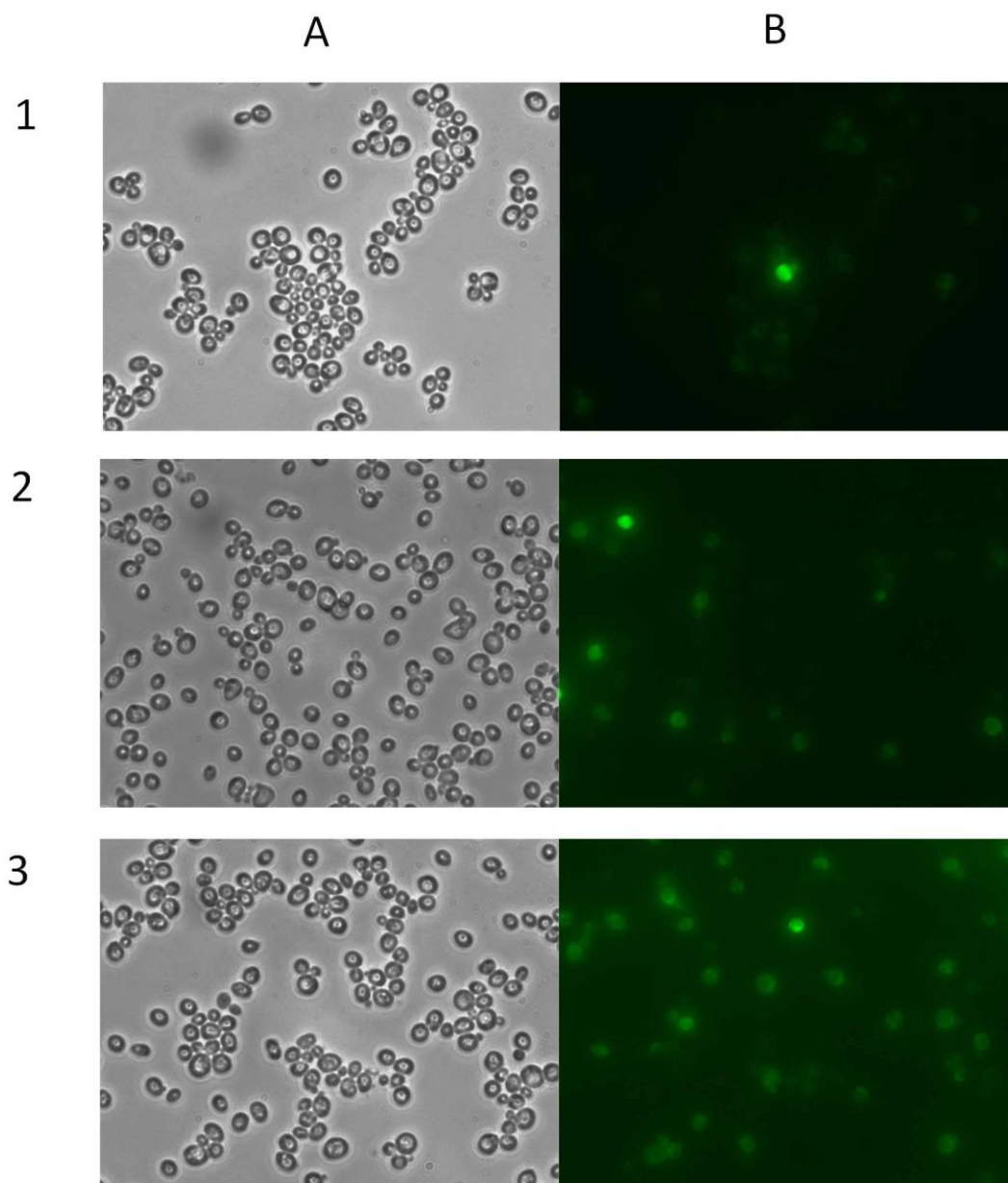


Figura 31 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741-WT – Coluna (A) representa as células no campo claro e a coluna (B) células coradas com DCFH. As linhas (A) situação controle (B) 0,5 mM e (C) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

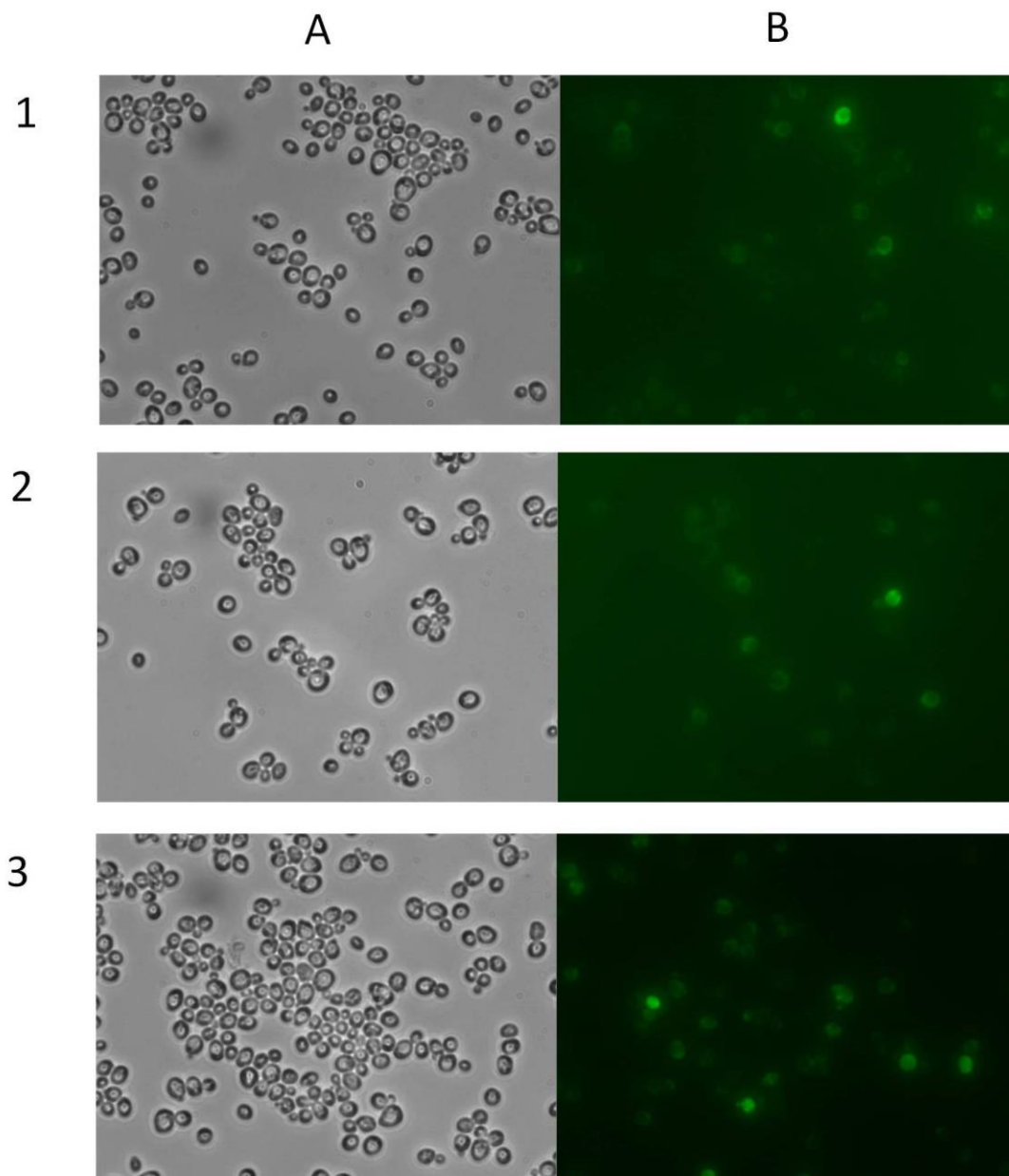


Figura 32 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura *Saccharomyces cerevisiae tps1Δ* – Coluna (A) representa as células no campo claro e a coluna (B) células coradas com DCFH. As linhas (A) situação controle (B) 0,5 mM e (C) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

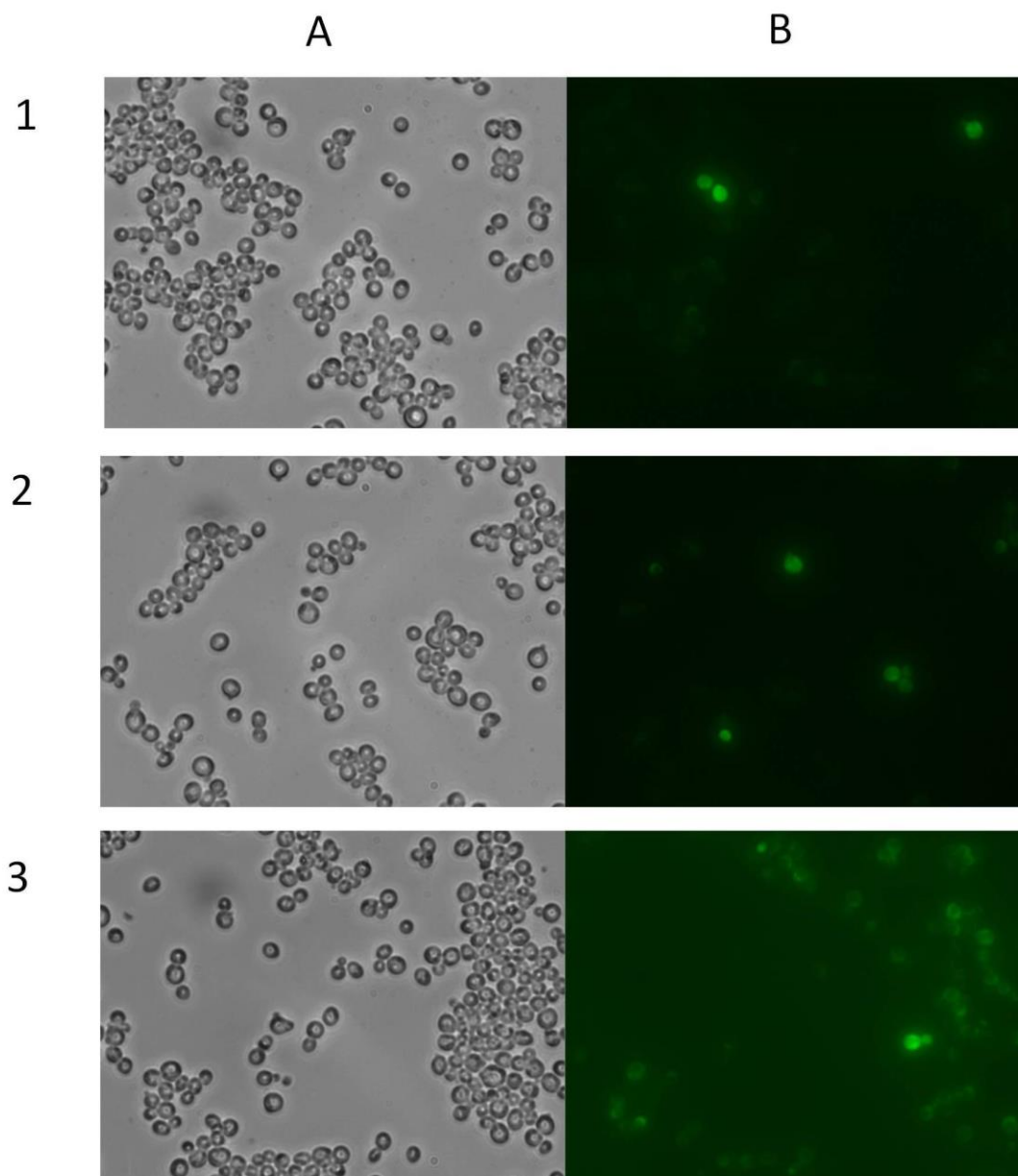


Figura 33 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura *Saccharomyces cerevisiae ahp1Δ* – A coluna (A) representa as células no campo claro e a coluna (B) células coradas com DCFH. As linhas (A) situação controle (B) 0,5 mM e (C) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

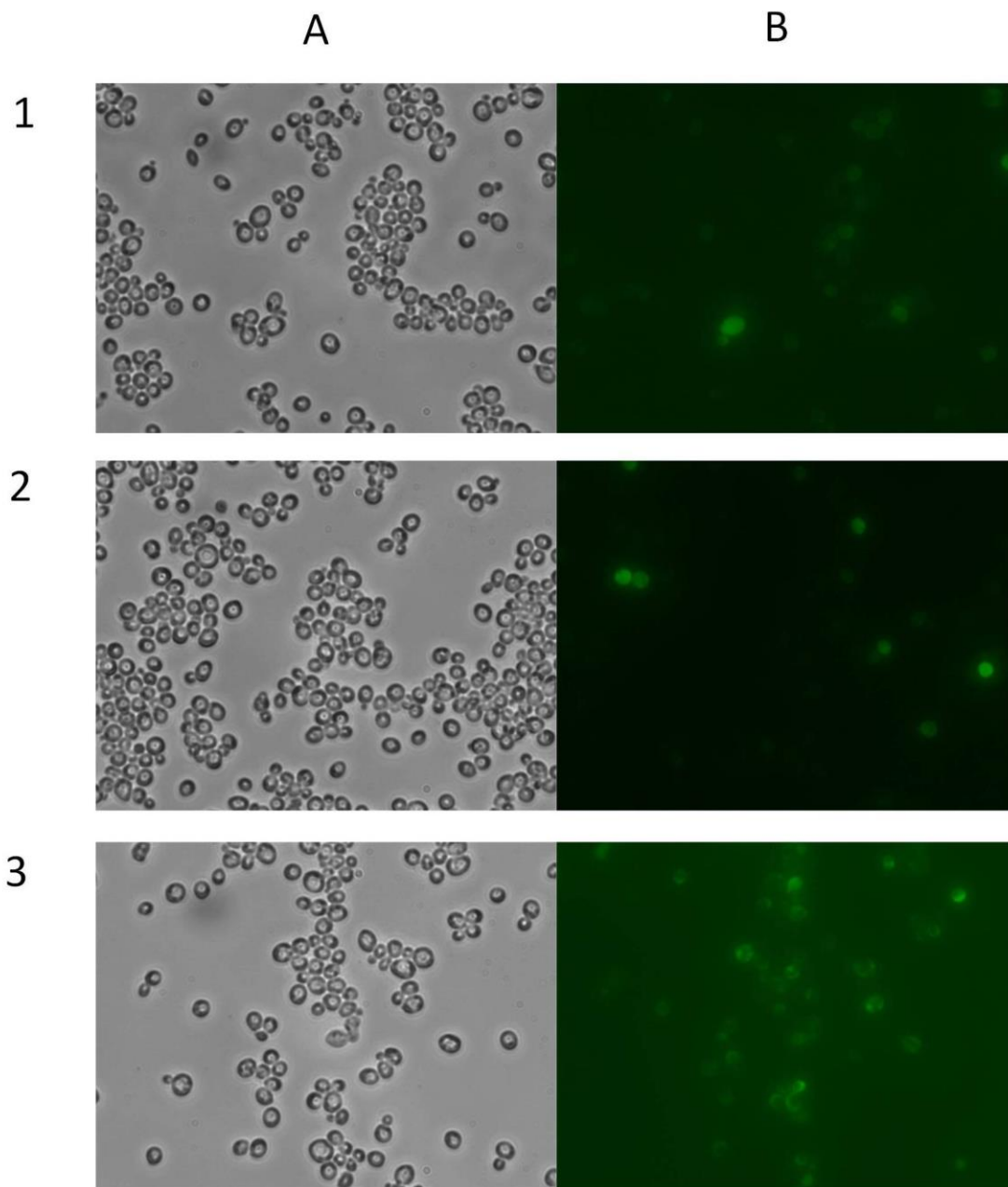


Figura 34 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura *Saccharomyces cerevisiae trk1Δ* – A coluna (A) representa as células no campo claro e a coluna (B) células coradas com DCFH. As linhas (A) situação controle (B) 0,5 mM e (C) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

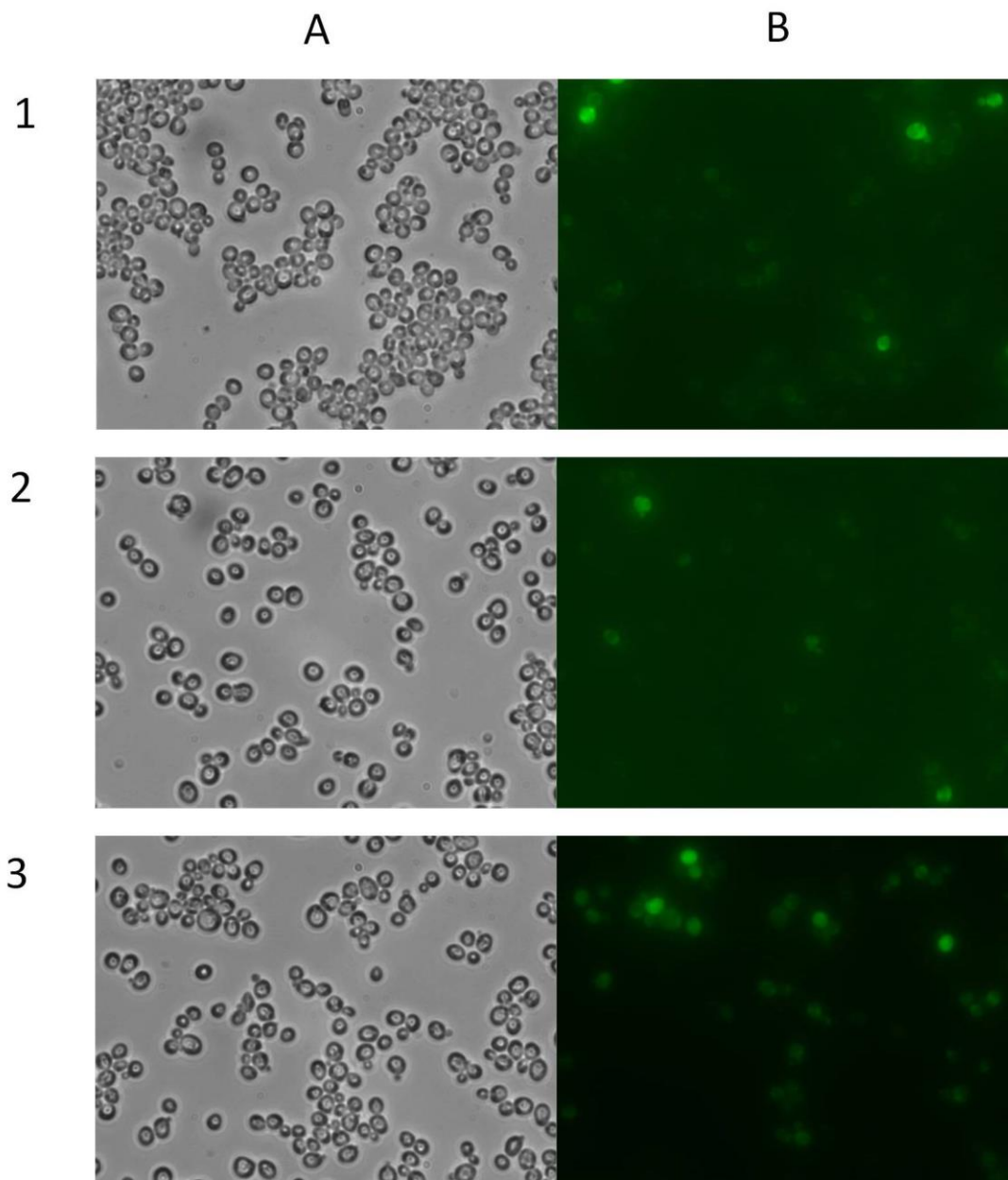


Figura 35 - Geração de espécies reativas de oxigênio na levedura *Saccharomyces cerevisiae trk2Δ* – A coluna (A) representa as células no campo claro e a coluna (B) células coradas com DCFH. As linhas (A) situação controle (B) 0,5 mM e (C) 4 mM de CdCl₂ (Aumento de 630 x).

5.9 - Avaliação do mecanismo de morte

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a linhagem *tps1Δ* (incapaz de sintetizar trealose), incorporou menos cádmio (tabela 3), apresentou maior perda de potássio (tabela 4), mostrou aumento de lipídeos peroxidados (figura 29), usou mais resíduos sulfidrílicos após o estresse (figura 30) e apresentou ROS intracelular (figura 32). Por outro lado, verificou-se que o número de células metabolicamente ativas (fig 17 e figura 23) foi superior ao número de células com capacidade de formar colônias (figura 16). Estes resultados nos levaram à necessidade de estudar fenômenos relacionados à morte celular, entre eles, a morte celular programada e/ou necrose. Assim, procedeu-se o estudo da visualização da morfologia da cromatina usando-se os fluoróforos DAPI e laranja de acridina (LA), também, estudamos a integridade da membrana usando brometo de etídio (BE) e, correlacionamos os resultados obtidos com estes fluoróforos com aqueles resultados já apresentados de formação de espécies reativas de oxigênio e perda de potássio após incorporação de Cd²⁺.

5.7.1 - Avaliação das alterações nucleares através da coloração com DAPI

A avaliação da condensação e fragmentação de cromatina é um típico marcador de apoptose, frequentemente observado em leveduras expostas a diversos estímulos (LUDOVICO *et al.*, 2005; BÜTTNER *et al.*, 2007). O núcleo de células apoptóticas apresenta cromatina muito condensada que pode ser corada por um composto capaz de penetrar as membranas de células apoptóticas, o 4'-6'-diamino-2-fenilindol (DAPI).

A análise dos resultados da tabela 6 mostrou que na linhagem *BY4741-WT*, na ausência de cloreto de cádmio, apenas 12% das células apresentaram condensação de DNA após serem coradas com DAPI. Enquanto nas células tratadas com 0,5mM e 4mM de cádmio, cerca de 61,9% e 64% foram coradas com DAPI respectivamente, apresentaram um aumento de 5 vezes no corante incorporado no DNA quando comparado ao controle (ausência de cádmio).

Em relação às células *tps1Δ*, observa-se na tabela 7, que mesmo na situação controle (ausência de cádmio), foi possível observar diferenças no comportamento

dessas células em relação à linhagem controle (*BY4741-WT*). A linhagem *tps1Δ* apresentou uma alta porcentagem de células com condensação de DNA, 52,9% apresentaram-se coradas com DAPI, na situação controle. E após incubação com cloreto de cádmio, (0,5 e 4 mM) as células apresentaram uma porcentagem ainda maior, 66,3% e 80,7%, respectivamente.

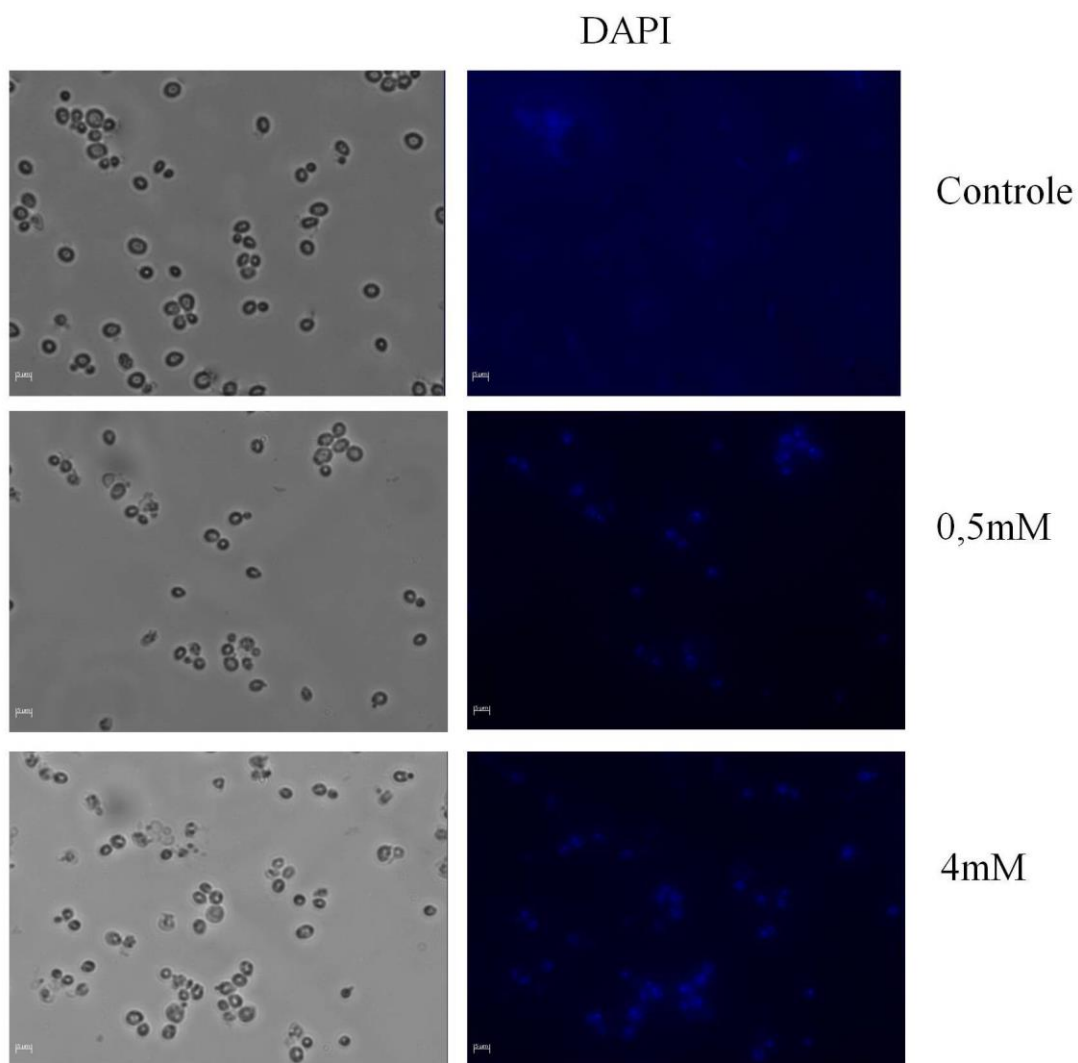


Figura 36 - Avaliação das alterações nucleares via coloração com DAPI - Linhagem *BY4741-WT* (Aumento de 630 x).

Tabela 6 - Porcentagem de células coradas com DAPI na linhagem *BY4741-WT*.

Situação	(%) células coradas com DAPI
Controle (sem CdCl ₂)	12 ± 0,9
0,5mM de CdCl ₂	61,9 ± 3,4
4mM de CdCl ₂	64 ± 3,1

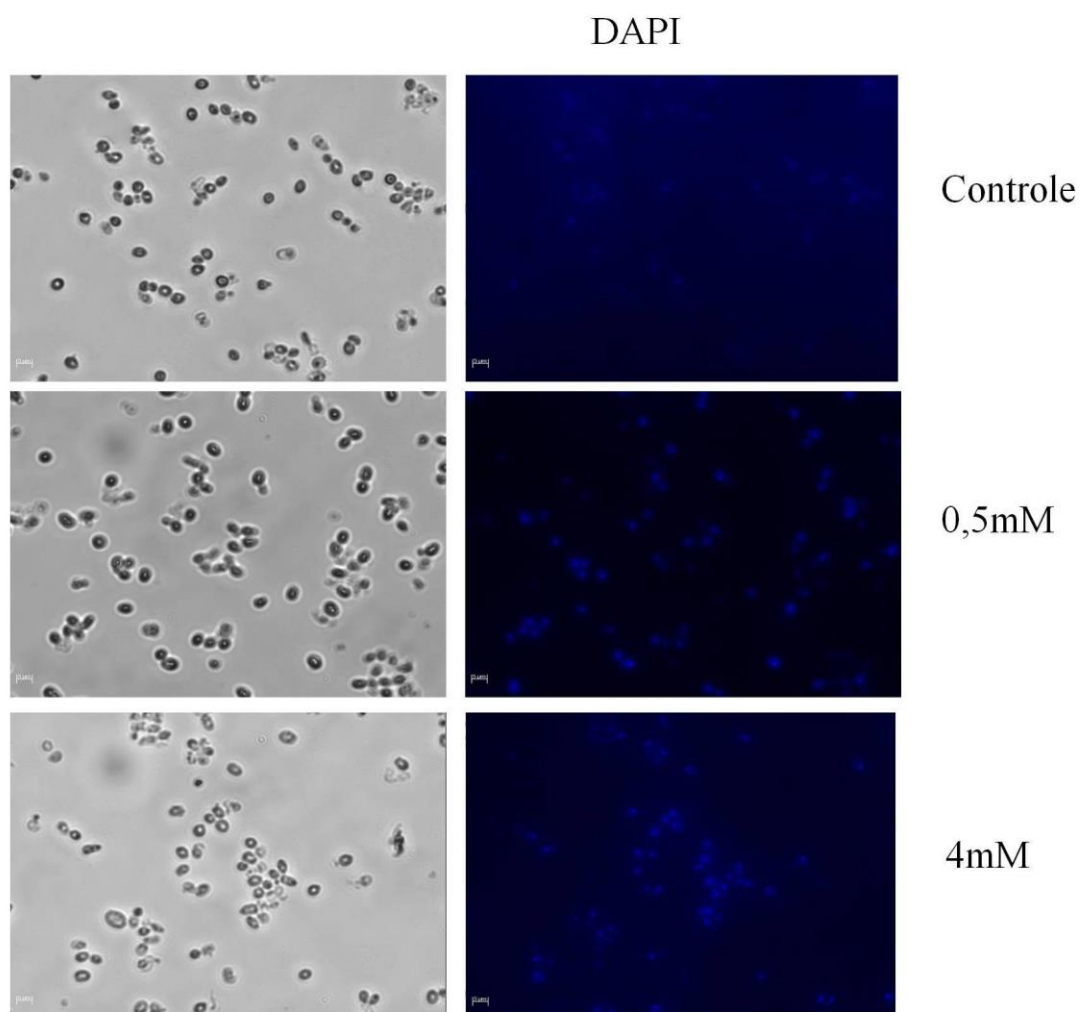


Figura 37 - Avaliação das alterações nucleares via coloração com DAPI - Linhagem *tps1Δ* (Aumento de 630 x).

Tabela 7 - Porcentagem de células coradas com DAPI na linhagem *tps1Δ*.

Situação	(%) células coradas com DAPI
Controle (sem CdCl ₂)	52,9 ± 4,1
0,5mM de CdCl ₂	66,3 ± 5,7
4mM de CdCl ₂	80,7 ± 6,2

5.7.2 - Avaliação das alterações nucleares por meio da coloração com Laranja de Acridina

A avaliação das alterações nucleares também pode ser realizada utilizando Laranja de Acridina (LA). Quando vistas por microscopia de fluorescência as células apoptóticas exibem um núcleo verde brilhante o que sugere intensa condensação de cromatina (BASKIC *et al.*, 2006). Quando o laranja de acridina é utilizado em conjunto com brometo de etídio (BE) pode-se diferenciar células vivas e apoptóticas, neste caso a fluorescência de LA é mascarada pela coloração de brometo de etídio.

Na tabela 8, foi observado que a linhagem *BY4741-WT* apresentou uma baixa proporção de células que se apresentaram coradas pelo brometo de etídio, tanto na situação controle, (sem o cádmio) quanto após a incorporação de cádmio durante 24 horas. Observou-se ainda que a porcentagem de células coradas com LA, na ausência de Cd^{+2} foram poucas, mas, este número aumentou bastante após o tratamento com Cd (tabela 8). Tomados em conjunto, estes resultados indicaram que independentemente do tratamento dispensados às células a proporção de células coradas pelo BE foi pequena, mas este panorama se alterou com uso de LA, evidenciando baixa proporção de células mortas por necrose (BE), porém alta proporção de células com características apoptóticas após tratamento com Cd^{+2} (células coradas com LA).

As células da mutante *tps1Δ*, apresentaram pequena proporção de células coradas com brometo de etídio, um indicativo da pequena quantidade de células mortas por necrose na situação controle 0,5 mM e 4 mM (tabela 9). Com relação à coloração com LA, as células *tps1Δ* já na situação controle apresentaram 51,8% das células coradas, e nas concentrações de 0,5mM e 4mM apresentaram 70,6% e 85%, respectivamente, do DNA corado com LA.

Os resultados acima apresentados e aqueles obtidos após a coloração com DAPI (tabela 6 e 7) foram analisados conjuntamente. Em ambos os resultados, observa-se que na presença do metal ocorreu aumento da condensação de DNA nas duas linhagens (*WT* e *tps1Δ*). A linhagem com ausência de trealose intracelular apresentou maior proporção de células com condensação de DNA mesmo na ausência do cádmio e, após a incubação com o metal, ocorreu um aumento de cromatina condensada, quando comparado com a linhagem *WT*. Assim, consideramos que a ausência da trealose facilitou a entrada das

células em apoptose, fato que explicaria a alta proporção de células coradas com LA e DAPI na situação controle e também a baixa tolerância dos mutantes *tps1Δ* em diferentes estresses, tais como: choque térmico, desidratação, etanol entre outros.

A perda da homeostase de potássio é também uma consequência da geração de ROS, é considerada crítica para os eventos que levam a apoptose em células animais (BORTNER & CIDLOWSKI, 2007). Resultado de Lauff & Santa Maria (2010) em *S. cerevisiae* demonstraram clara associação entre perda de K e apoptose. O presente trabalho mostrou que células da linhagem mutante *tps1Δ* apresentaram maior perda de potássio intracelular quando comparado com células da linhagem *BY4741-WT* e outros mutantes usados neste trabalho (tabela 4). Também observamos que o mutante *tps1Δ* apresentou mais radical livre naturalmente (ver fluorescência células situação controle figura 32) e após tratamento com cádmio, comparativamente às outras linhagens. Sabe-se que, um dos mecanismos pelos quais as células de eucariotos superiores e, inferiores desencadeiam o processo de morte celular programada (apoptose) é pela produção de espécies reativas do oxigênio (SIMON *et al.*, 2000; PERRONE *et al.*, 2008). Este resultado dá maior sustentação a ideia aqui desenvolvida, que a presença de trealose tende a limitar a entrada das células em apoptose.

De acordo com nossos resultados, a ausência de trealose pode acelerar a apoptose e este processo pode ser intensificado na presença de Cd^{2+} . Estes resultados revelam o papel protetor da trealose com relação a presença de Cd^{2+} em *S. cerevisiae*. O único resultado semelhante, correlacionando trealose e apoptose, que encontramos, foi o trabalho realizado por Lu e colaboradores (2011) com *C. albicans* usando mutantes de *tps1Δ* que também mostraram o papel protetor da trealose na apoptose em células tratadas com H_2O_2 . A literatura mostra dois trabalhos em que a adição de trealose no meio externo diminuiu o processo apoptótico: a trealose inibiu a fagocitose de plaquetas congeladas *in vitro* via prevenção da apoptose (LIU *et al.*, 2009), e também foi mostrado que a trealose protege células da superfície ocular de ratos do processo de apoptose induzido pelo ressecamento (CHEN *et al.*, 2009).

Assim, o conjunto de nossos resultados mostrou que a ausência da trealose em *S. cerevisiae* favoreceu a entrada das células em apoptose e, que este processo foi intensificado pela presença de cádmio.

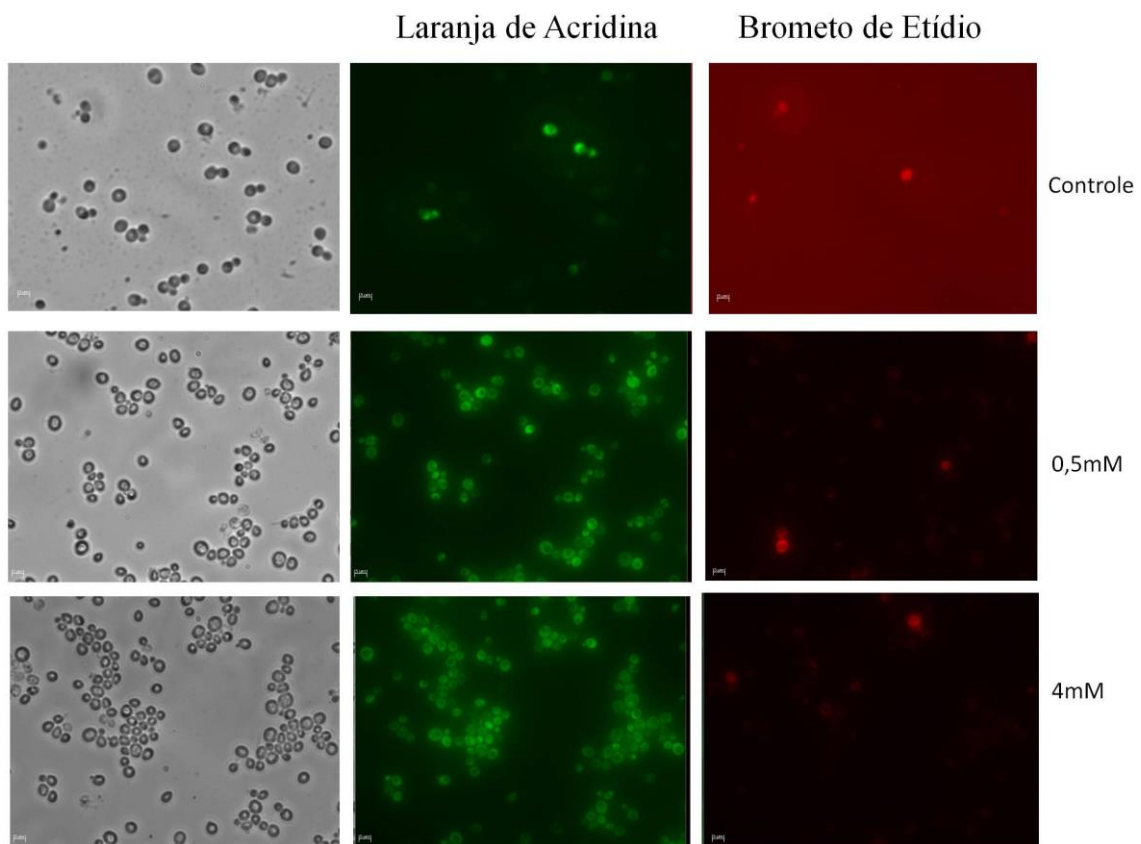


Figura 38 - Análise das alterações nucleares por meio da coloração com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio na linhagem *BY4741-WT* após 24 horas de incubação com cádmio (aumento de 630 x)

Tabela 8 - Porcentagem de células coradas com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio na linhagem *BY4741-WT*.

Situação	% coradas com Acridina	% coradas com Brometo de Etídio
Controle (sem CdCl ₂)	11,7 ± 0,8	7,8 ± 0,8
0,5 mM de CdCl ₂	66,6 ± 5,1	14 ± 0,8
4 mM de CdCl ₂	63 ± 3,7	7 ± 0,5

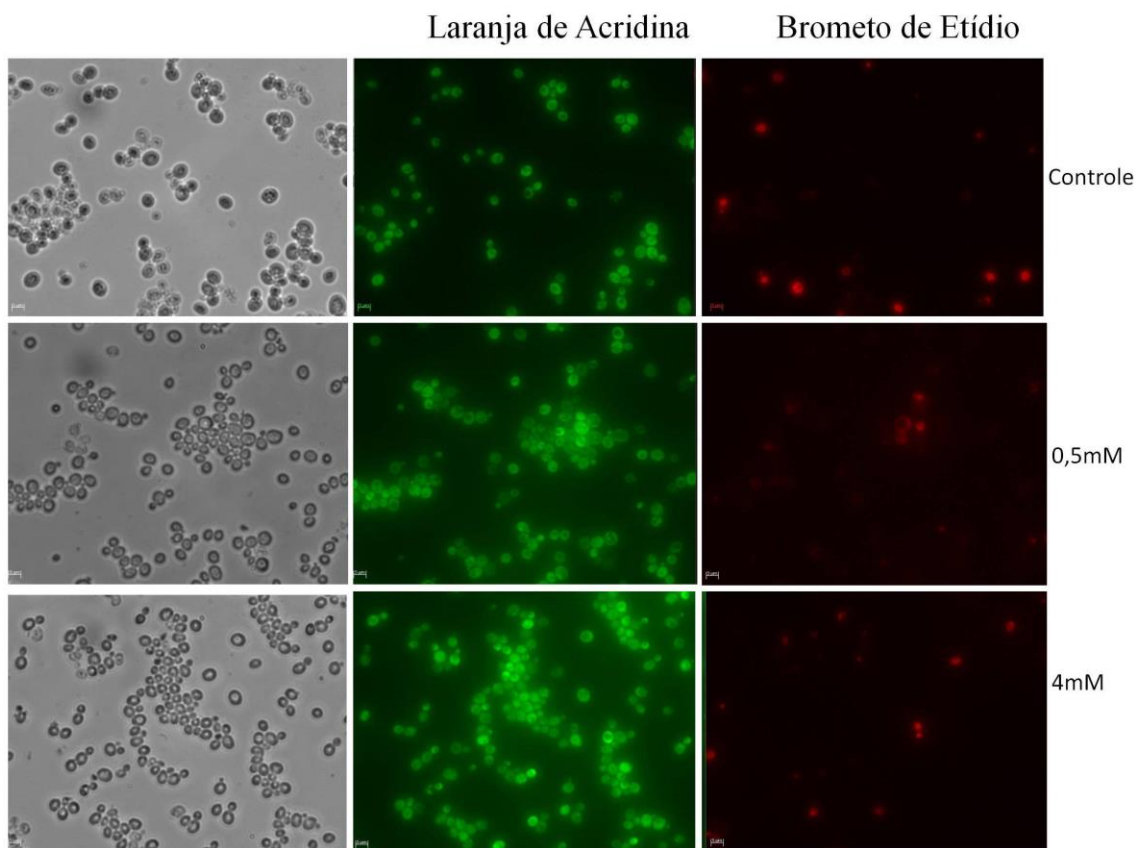


Figura 39 - Análise das alterações nucleares por meio da coloração com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio na linhagem *tps1Δ* após 24 horas de incubação com cádmio (aumento de 630 x).

Tabela 9 - Porcentagem de células coradas com Laranja de Acridina/Brometo de Etídio na linhagem *tps1Δ*.

Situação	% coradas com Acridina	% coradas com Brometo de Etídio
Controle (sem CdCl ₂)	51,8 ± 3,7	8,3 ± 0,3
0,5 mM de CdCl ₂	70,6 ± 6,8	8,3 ± 0,2
4 mM de CdCl ₂	85 ± 7,6	9,7 ± 0,7

6 - Conclusões

- A trealose protege as células dos danos aos lipídeos, reduz a utilização de resíduos SH, a geração de radicais livres e a incorporação de Cd^{2+} .
- A presença de trealose limita a entrada de células em apoptose.
- A enzima alquil hidroperoxi redutase apresenta importante papel na defesa aos danos lipídicos, porém não participa na incorporação de Cd^{2+} .
- As linhagens *trk1Δ* e *trk2Δ* (genes pertencentes ao sistema de transporte de K^+) não influenciam a incorporação de Cd^{2+} .

7 – Referências Bibliográficas

ADAMIS, P. D. B.; MANNARINO, S. C.; RIGER, C. J.; DUARTE, G.; CRUZ, A.; PEREIRA, M. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Lap4, a vacuolar aminopeptidase 1, is involved in cadmium-glutathione metabolism. **Biometals**, v. 22, p. 243-249, 2009.

ADAMIS, P. D. B.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. **Toxicology Letters**, v. 173, p. 1-7, 2007.

ADAMIS, P. D. B.; PANEK, A. D.; LEITE, S. G. F.; ELEUTHERIO, E. C. A. Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 55-60, 2003.

ADLE, D. J.; SINANI, D.; KIM, H.; LEE, J. A cadmium-transporting PIB-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 947-955, 2007.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Lista dos prováveis carcinogênicos e suas categorias. Disponível em: <http://www.cancer.org>> acesso em 17 de agosto de 2010

ATTFIELD, P. V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **FEBS Letters**, v. 225, n. 1, p. 259-263, 1987.

ASMUSS, M.; MULLENDERS, L. H.; EKER, A.; HARTWING, A. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 2097-2104, 2000.

ATSDR. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY. Public Health Statement. Cadmium. 2008. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>> Acesso em 14 de junho de 2011.

ARIÑO, J.; RAMOS, J.; SYCHROVÁ, H. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeast. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 1, p. 95-120, 2010.

BALLATORI, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 689-694, 2002.

BALZAN, R.; SAPIENZA, K.; GALEA, D. R.; VASSALO, N.; FREY, H.; BANNISTER, W-H. Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. **Microbiology**, v. 150, p. 109-115, 2004.

BANERJEE, S. & FLORES-ROZAS, H. Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2-MSH6 complex. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 1410-1419, 2005.

- BASKIC, D.; POPOVIC, S.; RISTIC, P.; ARSENIJEVIC, N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. **Cell Biology International**, v. 30, p. 924-932, 2006.
- BAUDOIN-CORNU, P., LABARRE, J. Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. **Biochimie**, v. 88, p.1673-1685, 2006.
- BELL, W.; SUN, W.; HOHMANN, S.; WERA, S.; REINDERS, A.; DE VIRGILIO, C.; WIEMKEN, A.; THEVELEIN, J. M. Composition and functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 50, p. 33311-33319, 1998.
- BELL, W.; KLAASSEN, P.; OHNACKER, M.; BOLLER, T.; HERWEIJER, M.; SCHOPPINK, P.; VAN DER ZEE, P.; WIEMKEN, A. Characterization of 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphatase synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of *CIF1*, a regulator of carbon catabolite inactivation. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 951-959, 1992.
- BENARDOUJ, N.; LEE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 24261-24267, 2001.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R.; Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 20313- 20316, 1997.
- BERTIN G., AVERBECK D. Cadmium: cellular effects, modification of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v.88, p.1549-1559, 2006.
- BORJERSON J., BELLANDER T., JÄRUP L., ELINDER C.G., MATTSON S. *In vivo* analysis of cadmium in battery workers versus measurements of blood, urine and work place air. **Journal of Occupational Environmental Medicine**, v.54, p.424-431, 1997.
- BORST-PAUWELS G. W. Ion transport in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 650, p. 88-127, 1981.
- BORTNER C. D. & CIDLOWSKI J. A. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 462, p. 176–188, 2007
- BRADY, D., DUNCAN, J.R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.1, p.149-159, 1994.

- BRENNAN, R.J., SCHIESTL, R.H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. **Mutation Research**, v. 356, p. 171-178, 1996.
- BRESSLER, J. P.; OLIVI, L.; CHEONG, J. H.; KIM, Y.; BANNONA, D. Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1012, p. 142-152, 2004.
- BRIDGES, C. .; ZALUPS, R. K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, p. 274-308, 2005.
- BRZÓSKA, M. M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Interactions between cadmium and zinc in the organism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 967-980, 2001.
- BURHANS, W.C.; WEINBERGER, M.; MARCHETTI, M. A.; RAMACHANDRAN, L.; DÚRSO, G.; HUBERMAN, J. A.; Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. **Mutation Research**, v. 532, p. 227-243, 2003.
- BÜTTNER S.; EISENBERG T.; CARMONA-GUTIERREZ D.; RULI D.; KNAUER H.; RUCKENSTUHL C.; SIGRIST C.; WISSING S.; KOLLROSER M.; FRÖHLICH K.-U.; SIGRIST S.; MADEO F. Endonuclease G regulates budding yeast life and death, **Molecular Cell**, v. 25, p. 233-246, 2007.
- CABIB, E.; LELOIR, L. F. The biosynthesis of trehalose phosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 231, p. 259-275, 1958.
- CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 1482-1495, 2006.
- CHAKRAVARTI, B.; CHAKRAVARTI, D.N. Oxidative modification of proteins: age-related changes. **Gerontology**, v. 53, p. 128-139, 2007.
- CHEN, W.; ZANG, X.; LIU, M.; ZHANG, J.; YE, Y. Trehalose protects against ocular surface disorders in experimental murine dry eye through suppression of apoptosis, **Experimental Eye Research**, v. 89, p. 311-318, 2009.
- COSTA-MOREIRA, L. M. Papel da **Trealose durante o estresse oxidativo causado por cádmio e a resposta adaptativa a este estresse em *Saccharomyces cerevisiae***. 2009. 111p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências e Tecnologia das Radiações Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2007.
- COSTA, V.; MORADA-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 217-246, 2001.

- DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003.
- DALLE-DONNE, I.; ALDINI, G.; CARINI, M.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.
- DAS, S.; KAHAN, N.; MUKHERJEE, S.; BAGCHI, D.; GURUSMY, N.; SWARTZ, H.; DAS, D.K. Redox regulation of resveratrol-mediated switching of death signal into survival signal. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, n. 1, p. 82-90, 2008.
- DAVIDSON, J. F.; SCHIESTL, R. H. Cytotoxic and Genotoxic consequences of heat stress are dependent on the presence of oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, p. 4580 – 4587, 2001.
- DELOM, F.; SZPONARSKI, W.; SOMMERER, N.; BOYER, J. C.; BRUNEAU, J. M.; ROSSIGNOL, M.; GIBRAT, R. The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. **Proteomics**, v. 6, p. 3029-3039, 2006.
- DEMASI, A. P. D.; PEREIRA, G. A. G.; NETOO, A. E. S. Yeast oxidative stress response – Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial function state. **FEBS Journal**, v. 273, p. 805-816, 2006
- DE VIRGILIO, C.; BÜRCKERT, N.; BELL, W.; JENO, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 212, p. 315-323, 1993.
- DIRMEIER, R.; O'BRIEN, K. M.; ENGLE, M.; DODD, A.; SPEARS, R.; POYTON, R. O. Exposure of yeast cells to anoxia induces transient oxidative stress implications for the induction of hypoxic genes. **Journal of Chemical Biology**, v. 20, p. 34773-34784, 2002.
- DIZ, D.; BRIDGHAM, J.T.; BRODERIUM, M.A.; BYERSDORFER, C.A.; EIDE, D.J. The FET4 gene encodes the low affinity Fe (II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 26092-26099, 1994.
- DU, L.; SU, Y.; SUN, D.; ZHU, W.; WANG, J.; ZHUANG, X.; ZHOU, S.; LU, Y. Formic acid induces Yca1p-independent apoptosis-like cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 531-539, 2008.
- DU, L.; YU, Y.; CHEN, J.; LIU, Y.; XIA, Y.; CHEN, Q.; LIU, X. Arsenic induces caspase and mitochondria-mediated apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 860-865, 2007.

- EISLER, H.; FRÖHLICH, K-U, HEIDENREICH, E. Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. **Experimental Cell Research**, v. 300, p. 345-353, 2004.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70-77, 1959.
- ELSKENS, M. T.; JASPERS, C.; PENNINGKX, M. J. Glutathione an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 637-644, 1991.
- EMYANITOFF, R. G.; WRIGHT, B. E. Effect of intracellular carbohydrates on heat resistance of *Dictyostellium discoideum* spores. **Journal of Bacteriology**, v. 140, p. 1008-1012, 1979.
- ERCAL, N., GURER-ORHAN, H., AYKIN-BURNS, N. Toxic Metals and oxidative stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.1, p. 529-539, 2001.
- ESTERAUBER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynoneal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.
- FANNJIANG, Y.; CHENG, W.C.; LEE, S.J.; QI, B.; PEVSNER, J.; McMCAFFERY, J. M.; BASANEZ, G.; HARDWICK, J. M.; Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. **Genes & Development**, v. 18, p. 2785-2797, 2004.
- FARCANASU, I. C.; HIRATA, D.; TSUCHIYA, E.; MIZUTA, K. MIYAKAWA, T. Involvement of Thioredoxin Peroxidase Type II (*Ahp1p*) of *Saccharomyces cerevisiae* in Mn²⁺ Homeostasis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, n. 11, p. 1871-1881, 1999.
- FAUCHON, M.; LAGNIEL, G.; AUDE, J. C.; LOMBARDIA, L.; SOULARUE, P.; PETAT, C.; MARGUERIE, G.; SENTENAC, A.; WERNER, M.; LABARRE, J. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. **Molecular Cell**, v. 9, p. 713-723, 2002.
- FAXÉN K.; GILDERSON, G.; ÄDELROTH, P.; BRZEZINSKI, P. A mechanistic principle for proton pumping by cytochrome c oxidase. **Nature**, v. 437, p. 286-289, 2005.
- FERREIRA A. L. A.; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.
- FINKEL, T. Oxygen Radicals and Signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p. 248-253, 1998.

- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-241, 2000.
- FRAGA, C. G.; SHIGENAGA, N. M. K.; PARK, J-W.; DEGADN, P.; AMES, B. N.; Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. **Medical Sciences**, v. 87, p. 4533-4537, 1990.
- FRANÇA, M. B. M; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Oxidative stress and its effects during dehydration. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 621-631, 2007.
- FRANKENBERG, D.; FRANKENBERG-SCHWAGNER, M.; HARBICH, R. Mechanisms of oxygen radiosensitization in irradiated yeast. I. DNA double-strand breakage. **International Journal of Radiation Biology**, v. 64, p. 511-521, 1993.
- FRATELLI, M.; DEMOL, H.; PUYPE, M.; CASAGRANDES, S.; EBERINI, I.; SALMONA, M.; BONETTO, V.; MENGOZZI, M.; DUFFIEUX, F.; MICLET, E.; BACHI, A.; VANDEKERCKHOVE, J.; GIANAZZA, E.; GHEZZI, P. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human Tlymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 3505-3510, 2002.
- FRÖHLICH, K-U; FUSSI, H.; RUCKENSTUHL, C. Yeast apoptosis from genes to pathways. **Seminars Cancer Biology**, v. 17, p. 112-121, 2007.
- GEWIES, A. Introduction of apoptosis. ApoReview, p. 1-26, 2003. Disponível em: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>> acesso em 15 de junho de 2011.
- GHEZZI, P.; BONETTO, V.; FRATELLI, M. Thiol-disulfite balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulations. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.7, p. 964-972, 2005.
- GIAGINIS, C.; GATZIDOU, E.; THEOCHARIS, S.; DNA repair system as target of cadmium toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, V. 213, P. 282-290, 2006.
- GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, p. 45-80, 2005
- GOMES, D.S.; FRAGOSO, L.C.; RIGER, C.J.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C.A. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1573, p. 21-25, 2002.
- GRANOT, D.; LEVINE, A.; DOR-HEFETZ, E. Sugar-induced apoptosis in yeast cells. **FEMS Yeast**, v. 4, p. 7-13, 2003.

GROSS, A., MCDONNELL, J.M.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 family members and mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, v. 13, p. 1899-1911, 1999.

GOURLAY, C. W.; AYSCOUGH, K. R.. Identification of an upstream regulatory pathway controlling actin-mediated apoptosis in yeast. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 2119-2132, 2005.

HADDAD-RIBEIRO, F. **Avaliação da capacidade de leveduras isoladas da fermentação da cachaça para biorremediação do cádmio**. 2009. 104p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências e Tecnologia das Radiações Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th ed. Oxford: Oxford, p. 851, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 1-14, 1984

HANSEN, J. M.; GO, Y. M.; JONES, D. P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v. 46, p. 215-234, 2006

HAUPTMANN, P.; LEHLE, L. Kex1 protease is involved in yeast cell death induced by defective N- glycosylation, acetic acid and chronological aging. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 19151-19163, 2008.

HENGARTNER, M. O. The Biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HENGARTNER, M. O. Apoptosis: DNA destroyers. **Nature**, v. 412, p. 27-29, 2001.

HERDEIRO, R.S.; PEREIRA, M. D.; PANEK, M.A. D.; ELEUTHERIO, E.C.A. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 340-346, 2006.

HERKER, E.; JUNGWIRTH, H.; LEHMANN, K.A.; MALDENER, C.; FRÖHLICH, K.U.; WISSING, S.; BÜTTNER, S.; FEHR, M.; SIGRIST, S.; MADEO, F. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. **The Journal of Cell Biology**, V. 164, P. 501-507, 2004.

HIMENO, S.; YANAGITA, T.; ENOMOTO, S.; KONDO, Y.; AMURA, N. Cellular cadmium uptake mediated by the transport system from manganese. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, 196, 43-50, 2002.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, p. 366-347, 2001.

- HOTTINGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with change of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. **FEBS Letters**, v. 220, p. 113-115, 1987.
- HOUBEN, K.; WASIELEWSKI, E.; DONINGUEZ, C.; KELLENBERGER, E.; ATKINSON, R. A.; TIMMERS, H. T.; KIEFFER, B.; BOELENS, R. Dynamics and metal exchange properties of C4C4 RING domains from CNOT4 and the p44 subunit of TFIIF. **Journal of Molecular Biology**, v. 349, p. 621-637, 2005.
- HOUNSA, C. G.; BRANDT, E. V.; THEVELEIN, J.; HOHMANN, S.; PRIOR, B. A. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. **Microbiology**, v. 144, p. 671-680, 1998.
- HOWLETT, N.; AVERY, S. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2971-2976, 1997a.
- HOWLETT, N.; AVERY, S. Relationship between cadmium sensitivity and degree of plasma membrane fatty acid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 539-545, 1997b.
- HO, K.; YAZAN, L. S.; ISMAIL, N.; ISMAIL, M. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. **Cancer Epidemiology**, v. 33, p. 155-160, 2009.
- HUI, L.; ZHU, Z. Y.; DONG, L.; JIA, X.; SUN, X.; YAN, L.; CHAI, Y.; JIANG, Y.; CAO, Y. Lack of trehalose accelerates H₂O₂-induced *Candida albicans* apoptosis through regulating Ca²⁺ signaling pathway and caspase activity. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-9, 2011.
- HUN, G.H.; DAMSZ, B. MATSUMOTO, T.K., REDDY, M. P.; RUS, A. M., IBEAS, J. I.; NARASIMHAN, M. L.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, v. 29, p. 649-659, 2002.
- INOUE, M.; SATO, E. F.; NICHIKAWA, M.; HIRAMOTO, K. KASHIWAGI, A. UTSUMI, K. Free radicals theory of apoptosis and metamorphosis. **Redox Report**, v. 9, p. 238-248, 2004.
- JAMIESON, D. J.; Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1511-1527, 1998.
- JÄRUP, L. Cadmium overload and toxicity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.17, p.35-39, 2002.

JÄRUP, L. BERGLUND M., ELINDER C.G., NORDBERG G., VAHTER M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. **Scandinavian Journal of Work Environment & Health**, v.24, p.1-51, 1998.

JENSEN, L.T.; CULOTTA, V.C. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by oxygen and iron. **Journal of Molecular Biology**, v. 318, p. 251-260, 2002.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidantes & Redox Signaling**, v. 8, p. 1865-1879, 2006

KALVELYTE, A.; IMBRASAITI, A.; BUKAUSKIENE, A.; VERSELIS, V. K.; BUKAUSKAS, F. F. Connexins and apoptotic transformation. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1661-1672, 2003.

KEFALA, M.I., ZOURBOULIS, A.I., MATIS, K. A. Biosorption of cadmium ions by *Actinomyces* and separation by flotation. **Environmental Pollution**, v.104, p.283-293, 1998.

KERN A. L.; BONATTO D.; DIAS J. F.; YONEMA M.; BRENDEL M.; HENRIQUES J. A. P. The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission. **Biometals**, v. 18, p. 31-41, 2005.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972a.

KERR, J. F. Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells. **The Journal of Pathology**, v. 107, p. 217-219, 1972b.

KILEY, P. J; STORZ, G. Exploiting thiol modifications. **PLoS Biology**, v. 2; p. 1714-1717, 2004.

KING, D. A.; HANNUM, D. M.; QI, J. S.; HURST, J. K. HOCl-mediated cell death and metabolic dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, p. 170-181, 2004.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, R.A.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUNEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHOVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 3-11, 2009.

LAFAYE, A.; JUNOT, C.; PEREIRA, Y.; LAGNIEL, G.; TABEL, J. C.; EZAN, E.; LABARRE, J. Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 24723-24730, 2005.

LANE, T.W., SAITO, M.A., GEORGE, G.N., PICKERING, I.J., PRINCE, R.C., MOREL, F.M. M. Biochemistry: A cadmium enzyme from a marine diatom. **Nature**, v.435, p.42, 2005.

LAUFF, D. B. & SANTA-MARÍA, G. E. Potassium deprivation is sufficient to induce a cell death program in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, p. 497-507, 2010.

LEE, S. M.; PARK, J. W. A yeast mutant lacking thiol-dependent protector protein in hypersensitive to menadione. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1382, p. 167-175, 1998.

LEE, J.; GODON, C.; LAGNIEL, G.; SPECTOR, D.; GARIN, J.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M.B. Yap1 and skn7 control two specialized oxidative stress response regulon in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**., v. 274, p. 16040-16046, 1999.

LEE, J.; SPECTOR, D.; GODON, C.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M. B. A new antioxidant with alkyl hydroperoxidase defense properties in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4537-4544, 1999.

LEIST, M.; JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 589-598, 2001.

LI L.Y.; LUO X.; WANG X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, **Nature**, v. 412, p. 95-99, 2001.

LI, Z.; SZCZYPKA, M.; LU, Y.; THIELE, D. J.; REAL, P. A. The yeast cadmium factor protein (YCF) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 6509-6517, 1996.

LI, Z.; LU, Y.; ZHEN, R.; SZCZYPKA, M.; THIELE, D.J. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport or bis(glutathionato) cadmium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 42-47, 1997.

LIANG, Q.; ZHOU, B. Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, p. 4741-4749, 2007.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

- LIU, J.; YINGMEI, Z.; HUANG, D.; SONG, G. Cadmium induced MTs synthesis via oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 280, p. 139-145, 2005.
- LIU, H-J.; LIU, D-H.; ZHONG, J-J. Interesting physiological response of the osmophilic yeast *Candida krusei* to heat shock. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 36, p. 409-416, 2005.
- LIU, Q.; XU, L.; JIAO, S. X.; WANG, T. X.; SONG, Y. Trehalose inhibited the phagocytosis of refrigerated platelets in vivo via preventing apoptosis. **Transfusion**, v. 49, p. 2158-2166, 2009.
- LIU, X. F., SUPEK, F., NELSON, N., CULOTTA, V. C. Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 11763-11769, 1997.
- LOON, B. V.; MARKKANEN, E.; HÜBSCHER, U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. **DNA repair**, p. 1-13, 2010.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, H. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265,275, 1951.
- LUDOVICO, P.; MADEO, F.; SILVA, M.T. Yeast programmed cell death: an intricate puzzle. **IUBMB Life**, v. 57, p. 129-135, 2005.
- LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F.; ALMEIDA, A.; SILVA, M. T., BARRIENTOS, A., CORTE-REAL, M. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 2598-2606, 2002.
- LUDOVICO, P.; SOUSA, M.J.; SILVA, M. T.; LEÃO, C.; CORTE-REAL, M. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology**, v. 147, p. 2409-2415, 2001.
- LUO, Y.; LI, W-M.; WANG, W.; Trehalose: protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress? **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 378-384, 2008.
- LUSHCHAK, V. I. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 4, p. 679-684, 2006.
- MAcDIARMID, C. W.; GARDNER, R.C. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 1727-1732, 1998)

- MACDIARMID, C. W.; GARTHER, A. L.; EIDE, D. Zinc transporter that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 19, p. 2845-2855, 2000.
- MADEO, F.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; RING, J.; BÜTTNER, S.; TOBIAS, E.; KROEMER, G. Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 382, p. 227-231, 2009.
- MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K-U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, p. 729-734, 1997.
- MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; LIGR, M. GREY, M.; SIGRIST, S. J.; WOLF H. D.; FRÖHLICH, K-U. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **The Journal of Cell Biology**, v. 145, p. 757-767, 1999.
- MADEO, F.; HERKER, E.; MALDENER, C.; WISSING, S.; LACHELT, S.; HERLAN, M.; FEHR, M.; LAUBER, K.; SIGRIST, S. J.; WESSELBORG, S.; FRÖHLICH, K. U. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. **Molecular Cell**, v. 9, p. 911-917, 2002.
- MAHMUD, S. A.; NAGAHISA, K.; HIRASAWA, T.; YOSHIKAWA, K.; ASHITANI, K.; SHIMIZU, H. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 26, p. 17-30, 2009.
- MARNETT, L. J. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. **IARC Scientific Publications**, v. 150, p. 17-27, 1999.
- MARTELLI, A.; ROUSSELET, E.; DYCKE, C.; BOURON, A.; MOULIS, J. M. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. **Biochimie**, v. 88, p. 1807-1814, 2006.
- MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; McGAHON, A. J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.A.A.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Early, redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p. 1545-1556, 1995.
- MARTÍNEZ-ESPARZA, M.; AGUINAGA, A.; GONZÁLES-PÁRRAGA, P.; GARCÍA-PEÑARRUBIA, P.; JOAULT, T.; ARGÜELLES, J. C. Role of trehalose in resistance to macrophage killing: study with a *tps1/tps1* trehalose-deficient mutant of *Candida albicans*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 384-394, 2007.
- MATTIAZZO-PREZOTTO, M.M. Comportamento de cobre, cádmio, cromo, níquel e zinco adicionados à solos de clima tropical em diferentes valores de pH. 1997.

197p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1994.

MAZZONI, C.; FALCONE, C.A. Caspase –dependent apoptosis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 1320-1327, 2008.

MAZZONI, C.; MANCINI, P.; MADEO, F.; PALERMO, V.; FALCONE, C.A. *Kluyveromyceslactis* mutant in essential gene KILSM4 shows phenotypic markers of apoptosis. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 29-35, 2003.

MEHDI K.; PENNINCKX M. J. An important role for glutathione and γ - glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 143, p. 1885–1889, 1997.

MEHDI, K.; THIERIE, J.; PENNINCKX, M. J. C-glutamyltranspeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione. **Biochemical Journal**., v. 359, p. 631-637, 2001.

MIGNOTTE, B. AND VAYSSIERE, J. Mitochondria and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, p. 1-15, 1998.

MULET, J. M.; ALEJANDRO, S.; ROMERO, C.; SERRANO, R. The trehalose pathway and intracellular glucose phosphates as modulators of potassium transport and general cation homeostasis in yeast. **Yeast**, v. 21, p. 569-582, 2004.

NAGY Z.; MONTIGNY C.; LEVERRIER P.; YEH S.; GOFFEAU A.; GARRIGOS M.; FALSON P. Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. **Biochimie**, v. 88, p. 1665-1671, 2006.

NAVARRETE, C.; PETREZLÉLYOVÁ, S.; BARRETO, L.; MARTÍNEZ, J. L.; ZAHRÁDKA, J.; ARIÑO, J.; SYCHROVÁ, H.; RAMOS, J. Lack of main K⁺ uptake system in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. **FEMS Yeast Research**, v. 10, p. 508-517, 2010.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal**, v. 24, p. 1311-1317, 2005.

OKU, K.; WATANABE, H.; KUBOTA, M.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M.; TSUJISAKA, Y. KOMORI, M.; INOUE, Y. SAKURAI, M. NMR e quantum chemical study on the OH...pi and CH...O interaction between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 12739-12748, 2003.

PALMITER, R. D. The elusive function of metallothioneins. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 95, p. 8428-8430, 1998.

- PANEK, A. D. Trehalose metabolism – new is in technological applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 169-181, 1995.
- PARROU, J. L.; JULES, M.; BELTRAN, G.; FRANÇOIS, J. Acid trehalase in yeast and filamentous fungi: Localization, regulation and physiological function. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.503-511, 2005.
- PEREIRA, E. J.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Protection against oxidation during dehydration of yeast. **Cell Stress & Chaperones**, v. 8, p. 120-124, 2003.
- PENNICKX, M. J.; ELSKENS, M. T. Metabolism and functions of glutathione in microorganisms. **Advances in Microbiology and Physiology**, v. 34, P. 239-301, 1993.
- PERRONE, G. G.; TAN, S. X.; DAWES, I. W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 7, p. 1354-1368, 2008.
- POTTS, R. J.; BESPALOV, I. A.; WALLACE, S. S.; MELAMEDE, R. J.; HART, B. A. Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein. **Toxicology**, v. 161, p. 25-38, 2001.
- POTTS, R. J.; WATKINS, R. D.; HART, B. A. Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. **Toxicology**, v. 184, p. 189-202, 2003.
- PUNTEL, R. L. **Caracterização da atividade pro-oxidante de diferentes agentes e estudo do potencial antioxidante de intermediários do Ciclo de Krebs sobre alterações oxidativas induzidas *in vitro***. 2008.114p. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 2008.
- REBBEOR, F. F.; CONNOLLY, G. C.; DUMONT, M. E.; BALLATORI, N. ATP-dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 33449-33454, 1998.
- REDDI, A. R.; JENSEN, L. T.; CULOTTA, V. C. Manganese homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 4722-4732, 2009.
- RHEE, S. G.; CHANG, T.S.; JEONG, W.; KANG, D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. **Molecules and Cells**. p.1-11, 2010.
- RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeast**, Springer, p. 101-121, 2006.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Potassium transport in fungi and plants, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 1-30, 2000.

ROONGRUANGSREE, U-T.; KJERULF-JENSEN, C.; OLSON, W.; LANGE, L. Viability test for thick walled fungal spores (ex: Oospores of *Peronospora manshurica*). **Journal of Phytopathology**, v. 123, p. 244-252, 1988.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B. Role of the non-respiratory in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, p. 1115-1144, 2003.

ROUX, A. E.; QUISSAC, A.; CHARTRAND, P.; FERBEYRE, G.; ROKEACH, L. A. Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. **Aging Cell**, v. 5, p. 345,357, 2006.

SAMPEDRO, J. G.; URIBE, S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 256/257, p. 319-327, 2004.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defense. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005

SERERO A., LOPES J., NICOLAS A., BOITEUX S. Yeast genes involved in cadmium tolerance: Identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity. **DNA Repair**, v.7, p.1262-1275, 2008.

SIES, H.; JONES, D. Oxidative Stress In: **Encyclopedia of Stress**. 2nd. [S.1]: Academic Press, v. 3, 102-104, 2007.

SIMONS, H.U.; HAJ-YENIA, A.; LEVI-SCHAFFER. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, p. 415-418, 2000.

STANDMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein Oxidation. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 191-208, 2000.

STANDMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 321-336, 1995.

SUH, J.H.; YUN, J. W.; KIM, D. S. Cation (K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) exchange Pb²⁺ accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 383-387, 1999.

SUZUKI, S. W.; ONODERA, J.; OHSUMI, Y. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondrial dysfunction. **PLOS ONE**, v. 6, p.1-8, 2011.

SYCHROVÁ, H. Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. **Physiological Research**, v. 53, p. 91-98, 2004.

TAKEUCHI, Y.; NOMURA, W.; OHDATE, T.; TAMASU, S.; MASUTANI, H.; MURATA, K.; IZAWA, S.; YODOI, J.; INOUE, Y. Release of thioredoxin from *Saccharomyces cerevisiae* with environmental stimuli: solubilization of thioredoxin with ethanol. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 75, p. 1393-1399, 2007.

TERESHINA, V. M. Thermotolerance in Fungi: The role of heat proteins and Trehalose. **Microbiology**, v. 74, p. 247-257, 2005.

TOMITA, G. Enhancement of fluorescence emission of acridine orange by nucleosides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 27, pp. 614-615, 2005.

VACHOVA, L.; PALKOVA, Z. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia, **The Journal of Cell Biology**, v. 169, p. 711-717, 2005.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidant in oxidative stress-induced cancer. **Chemical Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161-1208, 2005.

VAN AEIST, L.; HOHMANN, S.; BULAYA, B.; KONING W.; SIERKSTRA, L.; NEVES, M. J.; LUYTEN, K.; ALIJO, R.; RAMOS, J.; COCCETTI, P. MARTEGANI, E.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M.; BRANDÃO, R. B.; VAN DIJCK, P.; VANHALEWYN, M.; DURNEZ, M.; JANS, A. W. H.; THEVELEIN, J. M. Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 8, p. 927-943, 1993.

VENDEMIALE, G.; GRATTAGLIANO, I.; ALTOMARE, E. An uptake in the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, v. 29, p. 49-55, 1999.

VIDO, K.; SPECTOR, D.; LAGNIEL, G.; LOPES, S.; TOLEDANO, M. B.; LABARRE, J. A. Proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 8469-8474, 2001.

VOLESKY, B. Biosorption and biosorbents. In: **Biosorption of Heavy Metal. Florida: CRC Press**, cap.1.1, p.3-6, 1990.

VUORIO, O. E.; KALKKINEN, N.; LONDESBOROUGH, J. Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast

Saccharomyces cerevisiae. **European Journal of Biochemistry**, v. 216, p. 849-861, 1993.

WADSKOG, I.; MALDENER, C.; PROKSCH, A.; MADEO, F. ADLER, L. Yeast lacking the SRO7/SOP1-encoded tumor suppressor homologue show increase susceptibility to apoptosis-like cell death on exposure to NaCl stress. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 1436-1444, 2004.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 533, p. 107-120, 2003.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis in review. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.79, p.241-244, 2000.

WALKER, G. M. Yeast **Physiology and Biotechnology**. Ed. John Wiley and Sons Ltda. P. 88, 1998.

WHO. Nordic Council of Ministers: Cadmium Review. World Health Organization, p. 1-24,2003. Disponível em: http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_cadmium.pdf. Acesso: 15/07/2011.

WISSING S.; LUDOVICO P.; HERKER E.; BUTTNER S.; ENGELHARDT S.M.; DECKER T.; LINK A.; PROKSCH A.; RODRIGUES F.; CORTE-REAL M.; FRÖHLICH K.-U.; MANN S. J.; CANDÉ C.; SIGRIST S.J.; KROEMER G.; MADEO F. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast, **The Journal of cell biology**, v. 166, p. 969-974, 2004.

WU, R. F.; XU, Y. C.; MA, Z.; NWARIAKU, F. E.; SAROSI, J. G. A.; TERADA, L. S. Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. **Journal of Cell Biology**, v. 171, p. 893-904, 2005

WILLIAM, R. J. P. The natural selection of the chemical elements. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 816-829, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental health criteria n° 134: cadmium. 1989. Disponível em: <www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v024je01.htm>. Acesso em 19 setembro de 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Who food additives series n° 24: toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. 1992. Disponível em: <www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>. Acesso em 19 setembro de 2010.

WYLLIE, A.H.; BEATTIE, G.J.; HARGREAVES, A.D. Chromatin changes in apoptosis. **The Histochemical Journal**, v. 13, n. 4, p. 681-692, 1981.

YENUSH, L.; MERCHAN, S.; HOLMES, J. SERRANO, R. pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type-1-related Ppz1 phosphatase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 8683-8692, 2005.

ZAMGIROLAMI, D. M.; OLIVEIRA, A. H.; FERREIRA, A.V. Thermal and epithermal neutron fluence rates in the irradiation facilities of TRIGA IPR-R1 nuclear reactor. **Brazilian Journal of Physics**, v.40, n. 1, p.47-51, 2010.

ANEXOS

Insights into the cellular response of *Saccharomyces cerevisiae* challenged with cadmium in a strain with alkyl hydroperoxidase gene (AHP1) deletion

Luciana M. Costa-Moreira^{1,2}, Bárbara A. A. Porto¹, Flaviano S. Martins², Maria A. B.

C. Menezes¹, Carlos A. Rosa², Maria J. Neves^{1,*}

1 **Insights into the cellular response of *Saccharomyces cerevisiae***
2 **challenged with cadmium in a strain with alkyl hydroperoxidase**
3 **gene (AHP1) deletion**

4

5 Luciana M. Costa-Moreira^{1,2}, Bárbara A. A. Porto¹, Flaviano S. Martins², Maria A. B. C.6 Menezes¹, Carlos A. Rosa², Maria J. Neves^{1,*}

7

8 ¹Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional da Energia Nuclear
9 (CDTN/CNEN), Belo Horizonte, MG, Brazil10 ²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
11 Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

12

13

14 *Corresponding adress: Dr. Maria José Neves, Laboratório de Radiobiologia, Centro de
15 Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/ Comissão Nacional da Energia Nuclear, C.P. 941,
16 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel: +55 31 3069 3177. Fax: +55 31 3069 3159. E-
17 mail: nevesmj@cdtn.br

18

19 Running title: *S. cerevisiae* response to cadmium

20

21

22 Abstract

23 The presence of cadmium (Cd) in yeast cells generates free radicals. To avoid damage due to
24 free radicals, *Saccharomyces cerevisiae* developed an array of antioxidant defenses that
25 includes the peroxiredoxin system. One member of this system is the enzyme alkyl
26 hydroperoxidase reductase, encoded by the gene AHP1. The role of this enzyme was
27 evaluated by using a mutant without the gene AHP1. Intracellular determination of Cd,
28 sodium, potassium and the evaluation of lipid peroxidation and SH residues as biomarkers of
29 Cd damage in wild-type and *ahp1* mutant cells were analyzed. When compared to wild-type
30 cells, *ahp1* mutant presented similar growth in YEPD medium, high lipid peroxidation, high
31 intracellular concentration of Na⁺ and more K⁺ in the absence of stress. In tolerance assays,
32 *ahp1* is slightly more tolerant to Cd. Despite high membrane peroxidation, the mutant
33 presented Cd incorporation similar to wild-type cells when challenged with CdCl₂. The
34 presence of low Cd concentration in mutant cells tends to restore the same sodium level as
35 that of control wild-type cells. The GSH levels were similar to the control strain but the lipid
36 peroxidation index is higher in both the presence and absence of Cd. The sodium level is
37 higher in *ahp1* mutant compared to wild-type cells. The influence of GSH on potassium
38 efflux in spite of lipid peroxidation is found to be the first cause of this ionic movement.
39 These findings suggest the influence of AHP1 gene on ionic movement.

40

41 **Keywords:** Oxidative stress; Cadmium; *AHP1*; Sodium/Potassium efflux; Lipid peroxidation;
42 GSH.

43

44 **1. Introduction**

45 Cadmium (Cd) is a relatively abundant non-essential element that is widely used as a color
46 pigment in paints, electroplating and galvanizing, and batteries. It is also a by-product of zinc
47 and lead mining and smelting. The main source of Cd exposure for non-smokers is dietary
48 intake. Uptake and accumulation by plants represent the main entry pathway for potentially
49 health-threatening toxic metals into human and animal food. Cadmium is a highly toxic
50 environmental contaminant implicated in various diseases and it is ranked priority on a list of
51 20 hazardous substances by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry [1]. The
52 toxicity of Cd to microorganisms has attracted considerable research attention in recent years
53 due to the continuing anthropogenic mobilization of metal in the environment. As a primary
54 mechanism of toxicity, Cd causes disruption of cellular and organellar membrane resulting in
55 the rapid impairment of membrane function and loss of membrane integrity (Avery 2001).
56 Plasma-membrane permeabilization has been reported in a variety of microorganisms
57 following Cd exposure and is considered as a major mechanism of Cd toxicity in the yeast
58 *Saccharomyces cerevisiae* (Gadd *et al.* 1983). Cadmium-induced plasma membrane
59 permeabilization, with associated cellular K⁺ efflux, has been extensively reported for the
60 yeast *S. cerevisiae*. Preliminary evidence suggested elevated levels of lipid peroxidation in
61 Cd-exposed cells (Howlett *et al.* 1997). Cadmium also inhibits yeast glutathione reductase,
62 the enzyme responsible for the reduction of oxidized glutathione (GSSH) to reduced
63 glutathione (GSH) (Tandogan *et al.* 2007). Therefore, Cd poses a double threat to antioxidant
64 mechanisms in the cell, as it can either directly inhibit critical antioxidants or deplete
65 glutathione levels necessary for the function of these enzymes (Valko *et al.* 2005). Cadmium
66 is known as a cellular toxicant that increases reactive oxygen species (ROS) in *S. cerevisiae*
67 cells (Brennan *et al.* 1996). This metal binds to sulfhydryl groups that are common in
68 antioxidants and other enzymes, which reduce ROS. The binding of Cd results in the

69 inactivation of these enzymes and a consequent increase in ROS (Schmidt *et al.* 2009; Ercal *et*
70 *al.* 2001; Jarup *et al.* 1998). To protect themselves against the toxic ROS, aerobic organisms
71 are equipped with an array of defense mechanisms (Halliwell *et al.* 2007; Sies, 1993). One of
72 the antioxidative protective mechanisms present in cells is the peroxiredoxin family (Jacobson
73 *et al.* 1989; Chae *et al.* 1994). These classes of enzymes promote the elimination of H₂O₂ and
74 alkyl hydrogen peroxides by the use of thiol-reducing equivalent (Jarup *et al.* 1998). Five
75 peroxiredoxins have been discovered in *S. cerevisiae*, each with special cellular localization
76 and function (Park *et al.* 2000).

77 The alkyl hydroperoxidase reductase 1 (*Ahp1*) enzyme is encoded by *AHP1* gene and
78 it is a thioredoxin peroxidase of the peroxiredoxin family expressed by *S. cerevisiae* (Nguyễn-
79 Nhu *et al.* 2002). It is an antioxidant enzyme discovered in 1999 and is very abundant in the
80 cytosol of the yeast that functions as a cell surface defense against phospholipids peroxidation
81 (Ogita *et al.* 2005; Prouzet-Mauléon *et al.* 2002). *Ahp1* is known to scavenge a variety of
82 peroxides, reactive oxygen, and nitrogen species (Nguyễn-Nhu *et al.* 2002; Chae *et al.* 1994).
83 Putatively the strain with *aph1* deletion, in absence of stress, has an impairment of membrane
84 due to excess lipid damage. We, therefore, addressed whether membrane damage can
85 contribute for the Cd incorporation. To better understand the role of enzymatic protection of
86 *ahp1p* in *S. cerevisiae* against Cd toxicity, we examined the effect of metal Cd on a mutant
87 without *AHP1* gene.

88

89 2. Materials and methods

90 2.1 Yeast strains and culture conditions

91 The wild-type yeast strain BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) and the mutant
92 *ahp1* (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDR305c::kanMX4*) were acquired from
93 EUROSCARF, Frankfurt, Germany. A complete glucose medium (YEPD) containing 1 %
94 (w/v) yeast extract, 2 % (w/v) bactopectone, and 2 % (w/v) glucose was used for routine yeast
95 growth. The yeast strains were grown at ambient temperature with continuous rotation.
96 Thereafter, cells were reinoculated into fresh liquid medium in the presence or absence of
97 CdCl₂ and incubated for 24 h at ambient temperature at 160 rpm.

98

99 2.2 Growth curve and cell tolerance

100 Growth curve was performed in liquid medium by measuring the optical density at 600 nm in
101 a pre-determinate period. The analysis of cell tolerance was realized in solid medium (2 %
102 agar); 5 μl of yeast cells serially diluted 10-fold were spotted onto YEPD medium
103 supplemented with the indicated concentrations of cadmium chloride (CdCl₂) and incubated
104 at 30 °C for 3 days before photographed.

105

106 2.3. Cd, Na⁺, and K⁺ determination

107 Yeast strains were grown to stationary phase as starter cultures in YEPD medium for 24
108 hours. Triplicates (30 ml) under the 3 conditions, such as non-addition (control) of CdCl₂,
109 addition of 0.5 mM CdCl₂, and addition of 4 mM CdCl₂, were shaken in 250 ml Erlenmeyer
110 flasks on a reciprocal shaker at ambient temperature for 24 hours. The solution was filtered
111 (0.45 μm, 25 mm diameter Millipore HA membrane filters in reusable Millipore filter
112 holders), and the filters were washed 3 times immediately with 5 ml of cold water. The pellet
113 was scrapped, transferred to appropriate tubes, and dried at 70 °C for 2 days. The neutron

114 activation analysis, k_0 -method, was applied to determine the Cd, K^+ , and Na^+ concentrations
115 in the samples. The cells were weighed in the irradiation vials accompanied by standard
116 potentials of Cd, K^+ , Na^+ and were irradiated for 8 h in the TRIGA MARK I IPR-R1 research
117 nuclear reactor, located at CDTN/CNEN, at 100 kW; the average thermal neutron flux is $6.6 \times$
118 $10^{11} \text{ n.cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The gamma spectroscopy was performed on an HPGe detector with 15 %
119 efficiency. The characteristic peaks of each radionuclide were used to calculate the elemental
120 concentration (Cd, K^+ , and Na^+) in accordance with the methodology described by Menezes
121 (2003).

122

123 *2.4. Cellular extracts*

124 Extraction was performed by vortex with glass bead in sodium phosphate buffer 50 mM, pH
125 7.0 supplemented with EDTA 1 mM, PMSF 1 mM followed by centrifugation. The extracts
126 were utilized for the determination of lipid peroxidation and sulfhydryl analysis. Proteins
127 were determined by Lowry (Lowry *et al.* 1951) methods using BSA as standard.

128

129 *2.5 Measurement of lipid peroxidation*

130 Lipid peroxidation was quantified by the determination of thiobarbituric acid-reactive
131 substances (TBARS). TBARS were determined by a method adapted from that described by
132 Howlett and Avery (Howlett and Avery, 1997). Absorption was measured at 532 nm and a
133 molar extinction coefficient of $156 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used for the calculation of TBARS
134 concentration. Calibration curve was performed using malondialdehyde subjected to the same
135 treatment as that of the supernatants. Final results are expressed in malondialdehyde
136 (picomols)/protein (mg/ml).

137

138 *2.6 Sulfhydryl analysis*

139 The total sulfhydryl content was determined by the method of Ellman (Ellman, 1959), using
140 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The absorbance of the samples was measured at
141 412 nm in a spectrophotometer. The sulfhydryl content was inversely correlated to oxidative
142 damage to proteins. The results were calculated using the extinction coefficient for DTNB,
143 $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and expressed in $\mu\text{moles/mg prot/ml}$.

144

145 *2.7 Statistics*

146 The results were expressed as average shunting line standard for at least three different
147 experiments. The difference in statistics of the results was tested using Student's-*t* test with
148 significance levels of < 0.05 .

149

150 3. Results

151 Representative growth curves in liquid YEPD medium for the *ahp1* mutant and its
152 corresponding wild-type strain in the presence of different concentrations of CdCl₂ are shown
153 in Fig. 1A and B. The absence of the *AHP1* gene had barely influenced the growth in liquid
154 medium when compared to wild-type strain in control condition. The presence of increased
155 concentrations of CdCl₂ in *ahp1* and wild-type strain has the same effect; that is, an increased
156 concentration of Cd in the medium decreased the cellular growth. However, the inhibition of
157 growth was not verified completely (Fig. 1A and B) during tested time and with the
158 concentration used. Further, it was proceeded by the tolerance assay with serial dilutions of
159 wild-type strain and *aph1* cells on media containing increased concentration of CdCl₂ (Fig. 2).
160 All cells were plated on unsupplemented YEPD to determine a standard level of growth.
161 Mutant cells (*ahp1*) exhibited normal growth in YEPD medium when compared to wild-type
162 strain. The *ahp1* mutant was slightly more resistant to Cd than the wild-type strain since a
163 colony formation was observed at 0.1 mM and 0.125 mM with high cell concentration (Fig.
164 2). Complete growth inhibition was observed for both strains in more concentrated CdCl₂
165 (data not shown).

166 In our experimental procedure, the growth of the mutant *ahp1* seems to resist better than wild-
167 type strain in the presence of Cd. However, it was interesting to verify whether the differences
168 in Cd incorporation and ionic movement of Na⁺ and K⁺ were responsible for the discrete
169 resistance of *ahp1* mutant to the Cd. Given that Cd is not a nutritional metal ion, it is not
170 expected to be found on cells in physiological situation (controls Fig. 3A). In the absence of
171 Cd, the *aph1* deletion cells presented higher sodium levels, approximately 45 % more sodium
172 than wild-type strain (Fig. 3B) and an enhanced potassium level of 14 % (Fig. 3C) compared
173 to the wild-type strain. Wild-type strain and *ahp1* cells incubated in the presence of 0.5 mM
174 CdCl₂ for 24 h reveal incorporation of 2300 µg Cd/g cells and 1733 µg Cd/g cells on a dry

175 weight basis, respectively. When these levels of Cd were determined in cells, an accentuated
176 drop of 73 % of sodium in *ahp1* deletion cells was observed and the wild-type strain
177 maintained the same level of Na⁺ similar to that determined in control situation. Under the
178 same situation, the potassium level presented a small but significantly decreased level as
179 compared with the control situation for both strains.

180 In the presence of 4 mM CdCl₂, both strains presented a 10 times increasing in Cd
181 incorporation, and the concentration of Cd found on wild-type strain was similar to that found
182 in *ahp1* cells (Fig. 3A). The sodium level decreased approximately 40 % in relation to the
183 control situation of the two strains. The presence of 24000 µg of Cd in cells (Fig. 3A)
184 promoted a drop in potassium on the two strains (Fig. 3C). In the absence of *AHP1* gene, the
185 intracellular concentration of sodium was impaired; when compared to the wild-type cells in
186 control situation, the mutant accentuated more sodium inside cells, a discrete disturbance on
187 potassium level occurred with low entrance of Cd, and a great alteration of potassium
188 happened when high level of Cd was incorporated. The Na⁺ determination of the mutant
189 under control situation was found twice higher when compared to the wild-type strain.

190 The membrane damage was assessed by the determination of lipid peroxidation. The
191 occurrence of lipid peroxidation was estimated by measuring the formation of TBARS
192 substances. In control situation, that is, in the absence of Cd under physiological conditions,
193 *ahp1* cells presented a higher lipid oxidation (3 times more damages on lipid when compared
194 to the same situation in a wild-type strain - Fig. 4). In the presence of 0.5 mM CdCl₂, the
195 peroxidation levels on both strains presented almost the same value determined on the
196 respective control situation; that is, at this concentration (0.5 mM CdCl₂), different
197 antioxidant defense mechanisms can be activated and the presence of Cd inside cells did not
198 alter the peroxidation index, which was determined in the absence of intracellular Cd. At high
199 concentrations (4 mM CdCl₂), an increased lipid peroxidation was observed on the two

200 strains. The *aph1* mutant presented higher lipid peroxidation under the three conditions tested
201 when compared to the control strain, even with the same quantity of Cd incorporated by the
202 wild-type strain as shown in Fig. 3A. In that way, an induction of lipid peroxidation only with
203 4 mM CdCl₂ in wild-type strain and the *aph1* mutant was observed although the lipid
204 peroxidation was stronger in the *aph1* mutant than in the wild-type strain.

205 The determination of thiol residues is a determination of reduced glutathione (GSH), the
206 active form of glutathione (Jones *et al.* 2009). Depletion of GSH is considered a marker of
207 oxidative stress. Free radicals induced by metals and several compounds can oxidize GSH
208 producing GSSG and consequently diminution of SH residues. When 0.5 mM CdCl₂ was
209 added to the extracellular medium (Fig. 3A), intracellular Cd produced a small increase in
210 free SH residues after 24 h (Fig. 5). However, this could imply that the pool of reduced
211 glutathione increased in the presence of low level of intracellular Cd (Fig. 3A). Under this
212 situation, the cells were able to promote better defense against the oxidative attack. In the
213 presence of 4 mM CdCl₂ in extracellular medium a higher incorporation of Cd by the cells
214 was observed (Fig. 3A) thus depleting the free SH residues (Fig. 5). In this case, the cells
215 were under very stressful conditions, and the antioxidant defense mechanisms were not
216 efficient to counteract the oxidative conditions. Further, the results obtained during the lipid
217 peroxidation (Fig. 4) corroborated these.

218 Under physiological situation (absence of Cd), the determination of free SH groups obtained
219 for both strains were similar (Fig. 5). Generally, intense lipid peroxidation is associated with
220 diminution of glutathione levels (Kwolek-Mirek *et al.* 2009). However, in this study, this
221 relationship was observed only in the presence of 4 mM CdCl₂. In the absence of Cd, an
222 intense lipid peroxidation was observed in *aph1* cells (Fig. 4) without any interference on
223 glutathione level (Fig. 5). The increase in free SH residues with the addition of 0.5 mM CdCl₂
224 was most accentuated in wild-type cells when compared to *aph1* cells. Also, this could imply

225 that the pool of reduced glutathione increased the level of intracellular Cd (Fig. 3A); however,
226 *aph1* cells presented some difficulty in sustaining a similar level as obtained in wild-type cells
227 (Fig. 5). These confirm that the cells were able to promote better defense against the oxidative
228 attack in the presence of 0.5 mM CdCl₂, even without the presence of *AHP1* gene. In the
229 presence of 4 mM CdCl₂ in extracellular medium, a higher incorporation of Cd by the cells
230 (Fig. 3A), a drop in potassium (Fig. 3C) and free SH levels (Fig. 5), and an increase in lipid
231 peroxidation (Fig. 4) were observed. In this case, the cells were under very stressful
232 conditions and the antioxidant defense mechanisms were insufficient to counteract the
233 oxidative conditions. All results presented here corroborate this affirmation.

234

235 4. Discussion

236 The influence of the absence of the gene *AHP1* on the growth of cells is not consensual on the
237 literature. In this study, the growth of *ahp1* mutant cells is similar to that of wild-type cells in
238 liquid medium (Fig. 1). In tolerance assay (growth in the presence of Cd in a solid medium),
239 the mutant was a bit more tolerant than the wild-type cells, as the *ahp1* mutant was able to
240 form colonies at Cd concentrations, whereas the wild-type cells were unable to form (Fig. 2).
241 Lee et al. observed that in the presence of 0.1 mM CdSO₄ there was a slight decrease in the
242 growth due to the *ahp1* null mutation (Lee et al. 1999). Farcasanu (1999) related further, in
243 his studies with the mutant *ahp1*Δ, that this strain had a decreased tolerance to Mn²⁺ and
244 H₂O₂. On the other hand, Vido (2001) and Ngyên-nhu and Knoops (2002) reported that Cd
245 induced the same toxicity for *ahp1* mutant and wild-type yeasts.

246 The concentration of Cd incorporated by both strains was equivalent, and when the two
247 strains were compared, there was no difference although only the initial Cd concentration
248 used had interference (Fig. 3A). It is well known that *S. cerevisiae* has the ability to accumulate
249 metal ions in their cells to concentrations several orders of magnitude higher; normally, the
250 more concentrate is the metal in the external medium, the more metal is incorporated by cells
251 (data not shown). According to Brady and Duncan (1994), the mechanism of metal
252 accumulation may involve intracellular uptake and storage via active cation transport systems,
253 surface binding, or some undefined mechanisms. Here, we verified that under the same
254 conditions, the amount of Cd incorporated was similar (Fig. 3A) on both strains. However,
255 there was a stronger difference in sodium concentration on the mutant cells (Fig. 3B). Na⁺ is
256 abundant in many natural habitats and it becomes toxic when it accumulates within cells. K⁺
257 is the most abundant cation inside *S. cerevisiae* cells. It is involved in numerous functions and
258 its concentration in most of the yeast's natural habitats is low. Therefore, cells have relatively
259 high concentrations of K⁺ and low concentrations of Na⁺ (wild-type cells, Fig. 3B and C),

260 which are achieved by the coordinated functions of different transporters for cation influx and
261 efflux (Banuelos *et al.* 2002). The relation Na^+/K^+ presented a significant alteration on the
262 mutant. A high Na^+ level was determined in *ahp1* cells in normal situation, which means an
263 absence of Cd (Fig. 3B). The incorporation of Cd forced the efflux of Na^+ and K^+ , and this
264 condition increased the Na^+ level in mutant cells. As the net balance of influx/efflux of Na^+
265 and K^+ is necessary to maintain the membrane constraint, it was important to verify whether
266 the integrity of membrane was affected mainly. We also considered whether the mutant had a
267 deletion of *AHP1* gene and the enzyme encoded by this gene was able to remove hydrogen
268 peroxide and alkyl hydroperoxides, the compounds that promote damage to the membrane. In
269 this sense, the determination of lipid peroxidation (Fig. 4) was processed.

270 The mutant *ahp1* presented a high peroxidation on control situation, compared to wild-type
271 cells. This result suggests that the proper ability of yeast to defend itself from ROS generated
272 under aerobic conditions was strongly dependent on the detoxifying action of alkyl
273 hydroperoxide-reductase activity. Surprisingly, Nguyễn-Nhu and Knoop (2002) did notice
274 the same basic level of equivalent of MDA per mg protein in wild-type and the *ahp1* strains.
275 Those results suggest that after the deletion of the *AHP1* gene, lipid peroxidation did not
276 increase in the *ahp1* mutant under non-stressed culture conditions, which are exactly opposite
277 to the results obtained here.

278 In the presence of Cd, significant increase in the K^+ efflux was only determined with high
279 concentration of CdCl_2 (4 mM, Fig. 3C). However, the potassium efflux was also determined
280 by other authors in yeast cells by using different compounds like cobalt, silver, copper and
281 Cd. Also, it was considered as the cause of membrane permeabilization (Kessels *et al.* 1985;
282 Vagabov *et al.* 2008). Generally, the K^+ loss verified during the incorporation of metal is due
283 to the accumulation of lipid peroxidation products in the plasma membranes that result in the
284 damage of membrane function and as a result, there is K^+ efflux (Tandogan *et al.* 2007). Our

285 results showed that high lipid peroxidation occurs in the absence of Cd (Fig. 4, mutant in all
286 conditions tested). In these experiments, the potassium efflux was not very pronounced,
287 which means the lipid peroxidation is not the first cause of potassium release from the cells.
288 On the other hand, the high lipid peroxidation determined on the mutant strain did not
289 increase the Cd incorporation in accordance with the results shown in Fig. 3A. Apparently the
290 membranes of the two strains were intact since *ahp1* mutants maintain potassium level similar
291 to control strains (Fig. 3C) in spite of the high peroxidation determinate on this situation.
292 However, under control situation, these mutants had higher sodium when compared to that of
293 the wild-type strain (Fig. 3B). To explain the potassium efflux with high Cd concentration, it
294 is necessary to consider another mechanism different from membrane permeabilization due to
295 lipid peroxidation; in this way, we consider the role of glutathione once the Ahp1 enzyme acts
296 by reducing hydroperoxides with electrons donated by NADPH or other thiol-containing
297 intermediates. The glutathione may protect cells by (1) metal chelation and sequestration; (2)
298 protecting against metal-induced oxidation since glutathione is considered the main redox
299 buffer of the cell; and (3) binding to reactive sulfhydryl groups on proteins (glutathionylation)
300 to shield them from irreversible metal binding and/or oxidative damage (Baudouin-Cornu *et*
301 *al.* 2006). The potassium efflux can be correlated with reduced glutathione (GSH) as shown in
302 bacteria (Gillam *et al.* 2005). In this system, glutathione-S-conjugates and oxidized
303 glutathione (GSSG) can have an opposite effect to GSH and further, activate the system by
304 producing the K⁺ efflux. A relationship between cellular glutathione and the resistance of
305 yeast to certain products of lipid peroxidation is known (Turton *et al.* 1997). Yet, the
306 relationship between K⁺ efflux and GSH is unknown. Apparently, a similar mechanism
307 verified on bacteria can be involved in *S. cerevisiae* cells as indicated by the determination of
308 SH (Fig. 5). This study has shown that the sodium efflux, as in Fig. 3B, was most accentuated
309 on mutant cells and this is new. The addition of low level of Cd in mutant cells (Fig. 3A)

310 restore the same sodium (Fig. 3B) level as that of wild-type cells. Normally, to process
311 effective Na^+ extrusion, cells of most organisms generally use active transport systems,
312 mainly alkali-metal-cation/proton antiporters (Sychrová 2004). Apparently, this mechanism
313 can be influenced by the function of peroxiredoxin system once the Aph1 is part of the
314 peroxiredoxin cycle (Ogita *et al.* 2005). More detailed studies are necessary to verify whether
315 this mechanism is involved.

316

317 **References**

318

319 Avery SV (2001) Metal toxicity in yeast and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol*

320 49:111-142

321 Banuelos MA, Ruiz MC, Souciet AJJ-L et al (2002) Role of the Nha1 antiporter in regulating

322 K⁺ influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19:9-15

323 Baudouin-Cornu P, Labarre J (2006) Regulation of the cadmium stress response through

324 SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*,325 *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. *Biochimie* 88:1673-1685326 Brady D, Duncan JR (1994) Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*.327 *Appl Microbiol Biotechnol* 41:149–154328 Brennan RJ, Schiestl RH (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat*329 *Res* 356:171-178

330 Chae HZ, Robison K, Poole LB et al (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific

331 antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific

332 antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*

333 91:7017-7021.

334 Chae HZ, Uhm T, Rhee SG (1994) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential

335 role of cysteine 47. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7022-7026336 Elman GL (1959) Tissue Sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77

337 Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N (2001) Toxic metals and oxidative stress part I:

338 mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1:529-

339 539







- 340 Farcasanu IC, Hirata D, Tsuchiya E et al (1999) Involvement of Thioredoxin Peroxidase Type
341 II (Ahp1p) of *Saccharomyces cerevisiae* in Mn²⁺ Homeostasis. *Biosci Biotechnol*
342 *Biochem* 63:1871-1881
- 343 Gadd GM, Mowll JL (1983) The Relationship between cadmium uptake, potassium release
344 and viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 16:45-48
- 345 Gharieb MM, Gadd GM (2004) Role of glutathione in detoxification of metal(oid)s
346 *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* 17:183-188
- 347 Gillam DE, Bishop PL, Love NG (2005) A study of glutathione-gated potassium efflux in
348 biofilms using potassium microelectrodes. *Environ Eng Sci* 22:489-495
- 349 Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4 ed. Oxford
350 University Press
- 351 Howlett NG, Avery SV (1997) Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in
352 *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation.
353 *Appl Environ Microbiol* 63:2971-2976
- 354 Jacobson FS, Morgan RW, Christman MF et al (1989) An alkyl hydroperoxide reductase
355 from *Salmonella typhimurim* involved in the defense on DNA against oxidative
356 damage. Purification and properties. *J Biol Chem* 264:1488-1496.
- 357 Jarup L, Berglund M, Elinder CG et al (1998) Health effects of cadmium exposure - a review
358 of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 24:1-51
- 359 Jones DP, Liang Y (2009) Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. *Free Radical*
360 *Biol Med* 47:1329-1338
- 361 Kessels BGF, Belde PJM, Borst-Pauwels GWFH (1985) Protection of *Saccharomyces*
362 *cerevisiae* against Cd²⁺ Toxicity by Ca²⁺. *J Gen Microbiol* 131: 2533-2537

- 363 Kwolek-Mirek M, Bednarska S, Bartosz G et al (2009) Acrolein toxicity involves oxidative
364 stress caused by glutathione depletion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell
365 Biol Toxicol 25:363-378
- 366 Lee J, Spector D, Godon C et al (1999) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense
367 properties in yeast. J Biol Chem 274:4537-4544
- 368 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al (1951) Protein measurement with the folin phenol
369 reagent. J Biol Chem 193:265-275
- 370 Menezes MABC, Sabino CVS, Franco M.B et al (2003) k_0 -instrumental neutron activation
371 establishment at CDTN, Brazil: a successful story. J Radioanal Nucl Chem 257:627-
372 632
- 373 Nguyễn-Nhu NT, Knoop B (2002) Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces*
374 *cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. Toxicol Lett 135:219-
375 228
- 376 Ogita A, Hirooka K, Yamamoto Y et al (2005) Synergistic fungicidal activity of Cu(2+) and
377 allicin, an allyl sulfur compound from garlic, and its relation to the role of alkyl
378 hydroperoxide reductase 1 as a cell surface defense in *Saccharomyces cerevisiae*.
379 Toxicology 215:205-213
- 380 Park SG, Cha MK, Jeong W et al (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase
381 isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 275:5723-5732
- 382 Prouzet-Mauléon V, Monribot-Espagne C, Boucherie H et al (2002) Identification in
383 *Saccharomyces cerevisiae* of a new stable variant of alkyl hydroperoxide reductase 1
384 (Ahp1) induced by oxidative stress. J Biol Chem 277:4823-4830
- 385 Schmidt K, Wolfe DM, Stiller B et al (2009) Cd²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Se²⁺ toxicity to
386 *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2.
387 Biochem Biophys Res Commun 383:198-202

- 388 Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219
- 389 Sychrová H (2004) Yeast as a Model Organism to Study Transport and Homeostasis of Alkali
390 Metal Cations. *Physiol Res* 53:91-98
391
- 392 Tandogan B, Ulusu NN (2007) The inhibition kinetics of yeast glutathione reductase by some
393 metal ions. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22:489-495
- 394 Turton HE, Dawes IW, Grant CM (1997) *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a Yap-1-
395 mediated adaptive response to malondialdehyde. *J Bacteriol* 179:1096-1011
- 396 Vagabov VM, Ivanov AYU, Kulakovskaya TV et al (2008) Efflux of potassium ions from
397 cells and spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae* yeast treated with silver and
398 copper ions. *Biochemistry* 73:1224-1227
- 399 Valko M, Morris H, Cronin MTD (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med*
400 *Chem* 12:1161-1208
- 401 Vido K, Spector S, Lagniel G et al (2001) A proteome analysis of the cadmium response in
402 *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276:8469-8474
- 403 Waalkes MP (2000) Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem* 79:241-244
404

405 **Legend to figures**

406

407 **Fig. 1.** Representative experiment of cell growth response performed in liquid YEPD medium
408 with increased concentration of CdCl₂ in wild-type (A) and the *ahp1* mutant (B) cells.
409 Concentrations of CdCl₂ () control, () 0.05 mM, () 0.1 mM, () 0.15
410 mM, () 0.2 mM and () 0.25 mM. The results represent the mean of two individual
411 cultivations with triplicate samples at each time point.

412

413 **Fig. 2.** The deletion of *APH1* gene and the sensitivity to cadmium. Ten-fold serial dilutions of
414 wild-type and *aph1* cells were plated on YEPD medium and the medium supplemented with
415 Cd concentration are listed. Plates were done in triplicate and representative plates were
416 photographed after 3 days at 30 °C.

417

418 **Fig. 3.** Determination of cadmium (A), sodium (B) and potassium (C) incorporated by wild-
419 type (white bars) and *ahp1* (black bars) cells in the absence (control situation) and presence
420 of 0.5 and 4 mM of CdCl₂. The results are the mean ± S.E.M. of three independent measures.

421

422 **Fig. 4.** Lipid peroxidation. Levels of MDA measured by the TBARS method in wild-type
423 strain (white bars) and the *ahp1* mutant (black bars) after 24 h incubation with an indicated
424 concentration of CdCl₂. The results are the mean ± S.E.M. of three independent
425 measurements.

426

427 **Fig. 5.** Determination of free SH residues. The determination was done by Ellman's method
428 in wild-type (white bars) and the *ahp1* (black bars) mutant after 24 h incubation with

429 indicated concentrations of CdCl₂. The results are the mean \pm S.E.M. of three independent
430 measures.

Fig. 1

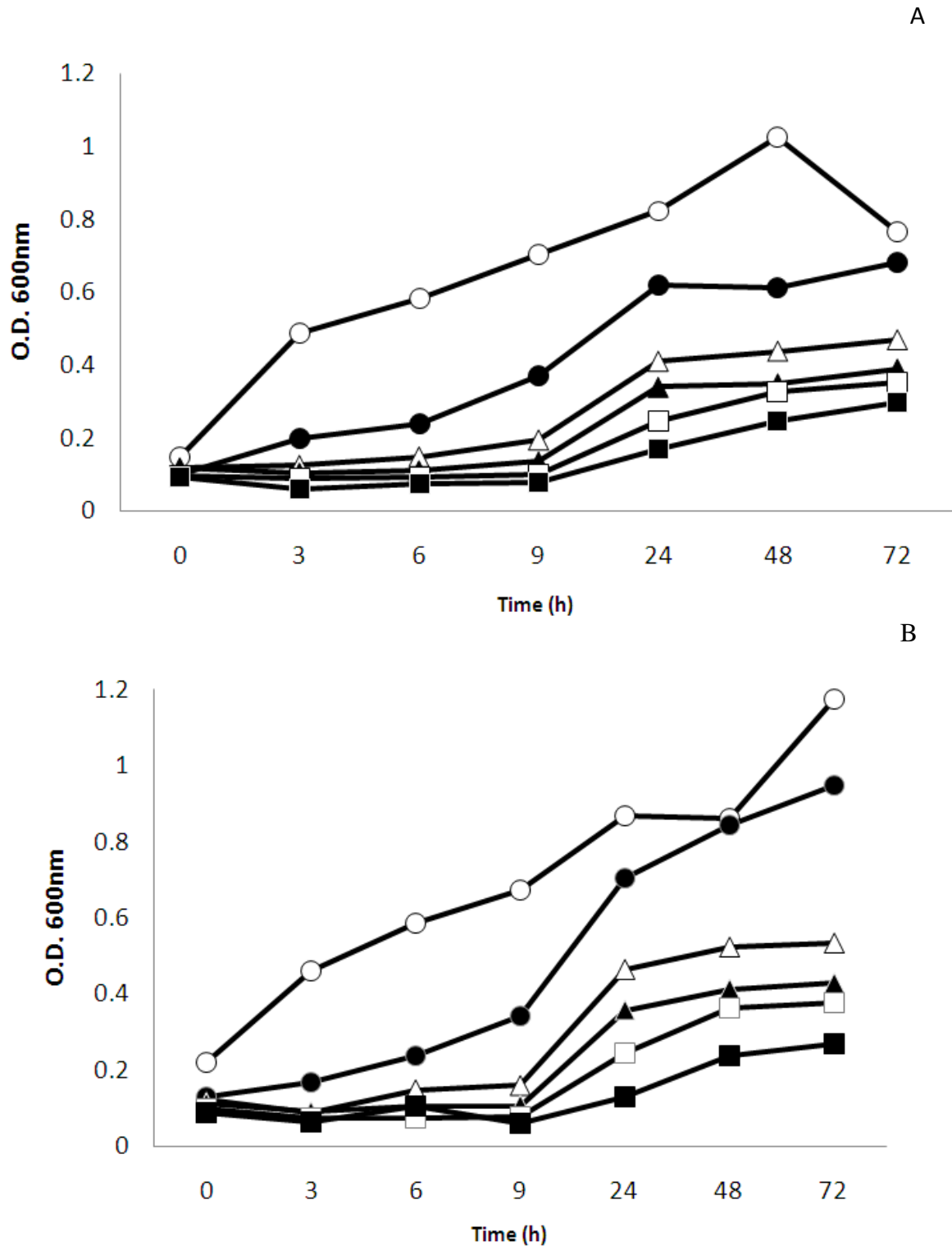


Fig. 2

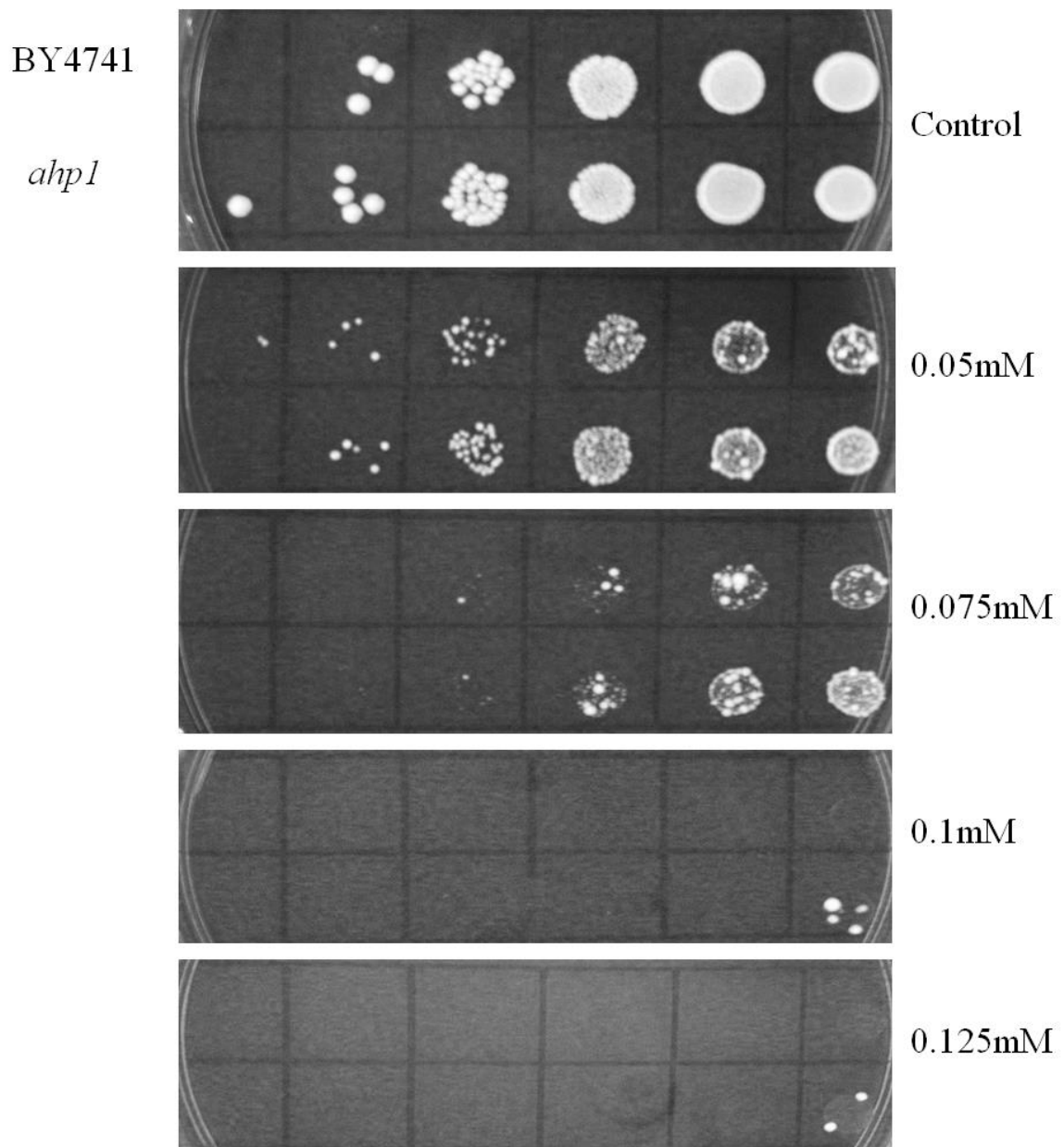


Fig. 3

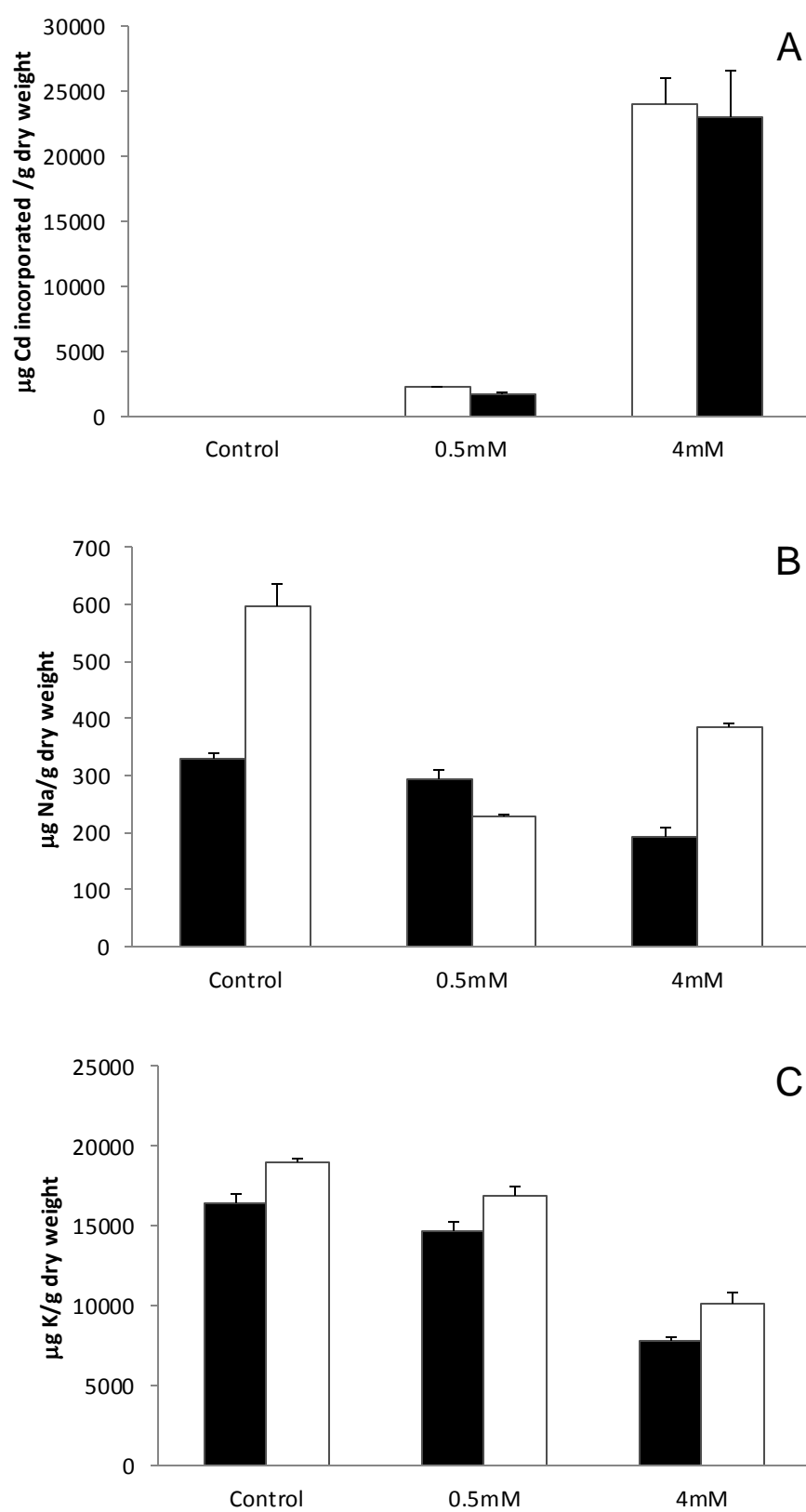
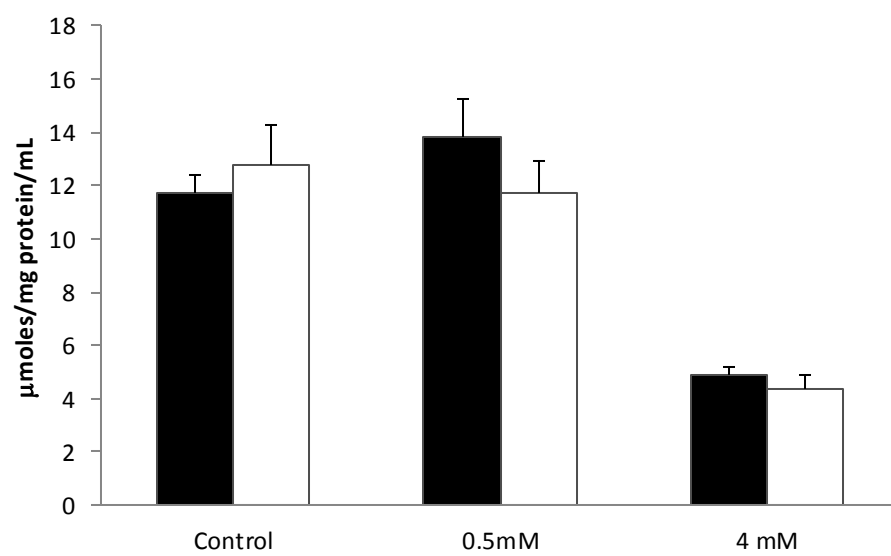


Fig. 4



432

Fig. 5

