



**Universidade de Évora**  
**Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Bioquímica**

– Dissertação –

## ***Stress por metais***

**Distúrbios em *Saccharomyces cerevisiae* ao nível do  
mitocondrio, retículo endoplasmático e citoplasma expostos ao  
pentóxido de vanádio**

**Ana Paula Silva Conim**

**Orientador:**

Prof. Doutor Rui Ferreira

(Departamento de Química/Universidade de Évora)

**Co-orientador:**

Prof.<sup>a</sup> Doutora Isabel Alves-Pereira

(Departamento de Química/Universidade de Évora)

Évora

**2010**



**Mestrado em Bioquímica**

– Dissertação –

## ***Stress por metais***

**Distúrbios em *Saccharomyces cerevisiae* ao nível do  
mitocondrio, retículo endoplasmático e citoplasma expostos ao  
pentóxido de vanádio**

**Ana Paula Silva Conim**

**Orientador:**

Prof. Doutor Rui Ferreira

(Departamento de Química/Universidade de Évora)

**Co-orientador:**

Prof.<sup>a</sup> Doutora Isabel Alves-Pereira

(Departamento de Química/Universidade de Évora)



***"A única certeza é que não existe certeza"***  
**(Plínio)**

***"O conhecimento chega, mas a sabedoria demora"***  
**(Alfred Tennyson)**



## Agradecimentos

A execução deste trabalho experimental contou com a ajuda de várias pessoas, que ajudaram na sua realização e que sem o seu apoio teria sido impossível. Deste modo quero deixar os meus agradecimentos:

Aos meus orientadores, o Prof. Rui Ferreira e a Prof.<sup>a</sup> Isabel Alves-Pereira pela orientação, paciência, apoio na resolução dos problemas e pelos conhecimentos transmitidos que me ajudaram a realizar este trabalho;

Ao Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), da Universidade de Évora pelo apoio financeiro e equipamento necessários à realização deste trabalho;

Ao Departamento de Química, Universidade de Évora pela disponibilização de espaço, reagentes e equipamento necessários à realização deste trabalho;

À Adega Cooperativa de Borba, em especial ao Eng. Óscar Gato, pela gentileza da cedência da levedura Red Fruit, essencial à realização deste estudo;

À Inês Vieira e à Raquel Ferro, pelos bons momentos passados, pelos conselhos, apoio e por me aturarem naqueles dias de “neura”;

À Ana Filipa, Carla Antunes, Carla Rosado, Elsa, Marta Candeias e Sara Gonçalves companheiras e colegas de várias horas no laboratório e que tornaram esse tempo menos “penoso” e mais fácil de passar com a sua companhia;

Aos meus pais por todo o esforço, sacrifício e confiança em mim depositada, que tudo fizeram para que eu pudesse chegar até aqui e que seria impossível sem eles;

À minha família pelo apoio dado, um especial agradecimento ao meu Avô, que infelizmente não vai estar presente quando terminar mais esta etapa, mas onde quer que esteja sei que ficará muito contente por mim;

E por fim, mas não o ultimo... Ao Helder por todo o apoio incondicional que me tem dado ao longo do tempo, pela compreensão naqueles momentos menos “bons”, paciência e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.





## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>x</b>
<b>Abreviaturas e nomenclatura de enzimas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. Fundamento teórico</b> .....	<b>1</b>
1.1. Vanádio .....	3
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
1.3. Espécies Reactivas de Oxigénio .....	8
1.3.1. Formação de ROS .....	9
1.3.2. Stress oxidativo .....	10
1.3.3. NADH desidrogenase .....	11
1.3.4. NADPH citocromo P450 desidrogenase .....	13
1.4. Danos causados pelas espécies reactivas de oxigénio .....	14
1.5. Sistemas de defesa antioxidante .....	16
1.6. Composição lipídica das membranas .....	21
<b>2. Problema e Objectivos</b> .....	<b>25</b>
2.1. Problema .....	27
2.2. Objectivo geral .....	29
2.3. Objectivos específicos .....	29
<b>3. Metodologia</b> .....	<b>31</b>
3.1. Estratégia .....	31
3.2. Procedimento Experimental .....	33
3.2.1. Material biológico .....	33
3.2.2. Meios de cultura .....	33
3.2.3. Cultura de microrganismos .....	34
3.2.4. Obtenção das fracções mitocondrial, microssomal e citosólica .....	34
3.2.5. Obtenção do extracto enriquecido em lípidos, ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos .....	35
3.2.6. Quantificação do conteúdo em ergosterol .....	35
3.2.7. Quantificação do conteúdo em triacilgliceróis .....	36

3.2.8.	Quantificação do conteúdo em fosfolípidos	36
3.2.9.	Quantificação de proteínas totais	37
3.2.10.	Determinação de GSH e GSSG	37
3.2.11.	Determinação do MDA	38
3.2.12.	Determinação de Actividades Enzimáticas	38
3.2.12.1.	NADH (ubiquinona) desidrogenase	38
3.2.12.2.	NADPH (P450) desidrogenase	39
3.2.12.3.	Catalase T	40
3.2.12.4.	Glucose-6-fosfato desidrogenase	40
3.2.12.5.	Glutatio no redutase	41
3.2.12.6.	Glutatio no peroxidase	41
3.2.13.	Análise estatística dos resultados	42
3.3.	Diagrama do trabalho	43
3.4.	Material	44
3.5.	Equipamento	44
3.6.	Reagentes	45
<b>4.</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>47</b>
4.1.	Efeito do pentóxido de vanádio sobre a sobrevivência celular de <i>S. cerevisiae</i>	49
4.2.	Efeito do pentóxido de vanádio na capacidade antioxidante vs danos celulares	52
4.3.	Efeito do pentóxido de vanádio sobre NADH desidrogenase, capacidade antioxidante e ambiente lipídico do mitocôndrio	57
4.4.	Efeito do pentóxido de vanádio sobre a NADPH P450 desidrogenase e ambiente lipídico microsomal	60
<b>5.</b>	<b>Conclusões</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>69</b>
<b>A.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>77</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1: Ilustração das colorações que o vanádio pode assumir consoante o seu estado de oxidação.</b>	3
<b>Figura 1.2: Interconversão das espécies reactivas de oxigénio</b>	9
<b>Figura 1.3: Modelo computacional que ilustra o enzima CPR em conformação aberta e fechada numa bicamada lipídica.</b>	13
<b>Figura 1.4: Diagrama representativo da transferência de electrões no retículo endoplasmático.</b>	14
<b>Figura 1.5: Representação esquemática da estrutura química do Glutationo (GSH).</b>	17
<b>Figura 4.1: Curva de crescimento das estirpes <i>S. cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 em YEPD ou YEPD-V.</b>	49
<b>Figura 4.2: Imagem fotográfica de placa de UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 para obtenção de cfu.</b>	50
<b>Figura 4.3: Biomassa total em peso seco produzida pelas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 crescidas em YEPD ou YEPD-V.</b>	50
<b>Figura 4.4: Registo fotográfico das culturas das estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 ao longo do tempo.</b>	51
<b>Figura 4.5: Actividade enzimática glutatono redutase nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	52
<b>Figura 4.6: Actividade enzimática glutatono peroxidase nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	53
<b>Figura 4.7: Actividade enzimática glucose-6-fosfato desidrogenase nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	54
<b>Figura 4.8: Actividade enzimática catalase T nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	55
<b>Figura 4.9: Quantificação do MDA nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	55
<b>Figura 4.10: Actividade enzimática NADH desidrogenase nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	57
<b>Figura 4.11: Quantificação da razão de GSH e GSSG nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	58
<b>Figura 4.12: Doseamento no extracto lipídico da membrana mitocondrial nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	59
<b>Figura 4.13: Actividade enzimática NADPH (P450) desidrogenase das estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	60
<b>Figura 4.14: Doseamento no extrato lipídico da membrana do retículo endoplasmático nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	61
<b>Figura A.1: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na quantificação de ergosterol, utilizando uma solução padrão de colesterol (0 - 100 µM)</b>	79
<b>Figura A.2: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na quantificação de triacilgliceróis, utilizando uma solução padrão de triacilgliceróis (0 - 40 µM)</b>	79
<b>Figura A.3: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na quantificação de fosfolípidos, utilizando uma solução padrão de fosfolípidos (0 - 80 µM)</b>	79
<b>Figura A.4: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na determinação da proteína total, utilizando uma solução padrão de BSA (0 - 200 µg/mL).</b>	80
<b>Figura A.5: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na determinação de GSH, utilizando uma solução padrão de GSH (0 - 5 µM)</b>	80
<b>Figura A.6: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na determinação de GSSG, utilizando uma solução padrão de GSSG (0 - 12 µM)</b>	80
<b>Figura A.7: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na determinação de MDA, utilizando uma solução padrão de MDA (0 - 100 µM)</b>	81
<b>Figura A.8: Representação gráfica das curvas de reacção da NADH desidrogenase em meio YEPD de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	81

<b>Figura A.9: Representação gráfica das curvas de reacção da NADH desidrogenase em meio YEPD-V de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	81
<b>Figura A.10: Representação gráfica das curvas de reacção da NADPH desidrogenase em meio YEPD de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	82
<b>Figura A.11: Representação gráfica das curvas de reacção da NADPH desidrogenase em meio YEPD-V de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	82
<b>Figura A.12: Representação gráfica das curvas de reacção da Catalase T em meio YEPD de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	82
<b>Figura A.13: Representação gráfica das curvas de reacção da Catalase T em meio YEPD-V de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	83
<b>Figura A.14: Representação gráfica das curvas de reacção da Glucose-6-fosfato desidrogenase em meio YEPD de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	83
<b>Figura A.15: Representação gráfica das curvas de reacção da Glucose-6-fosfato desidrogenase em meio YEPD-V de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	83
<b>Figura A.16: Representação gráfica das curvas de reacção da Glutatioo redutase em meio YEPD de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	84
<b>Figura A.17: Representação gráfica das curvas de reacção da Glutatioo redutase em meio YEPD-V de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	84
<b>Figura A.18: Representação gráfica das curvas de reacção da Glutatioo peroxidase em meio YEPD de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	84
<b>Figura A.19: Representação gráfica das curvas de reacção da Glutatioo peroxidase em meio YEPD-V de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.</b>	85

## Índice de tabelas

<b>Tabela A.1: Resultados da análise de variância (modelo "ANOVA-ONE WAY")</b>	85
<b>Tabela A.2: Continuação dos resultados da análise de variância (modelo "ANOVA-ONE WAY")</b>	86

## Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

	γ-glutamil ciclotransferase (EC 2.3.2.4)
5-OPase	5-oxoprolinase (EC 3.5.2.9)
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro de bovino
CAT A	Catalase A (EC 1.11.1.6)
CAT T	Catalase T (EC 1.11.1.6)
cfu	Unidades formadoras de colónias
CPR	NADPH citocromo P450 desidrogenase (EC 1.6.2.4)
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERG	Ergosterol
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina, forma oxidada
FMN	Mononucleótido de flavina
G6PD	Glucose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)
GCS	γ-glutamilcisteína sintetase (EC 6.3.2.2)
GDP	Glicerol-3-fosfato desidrogenase (E C 1.1.1.8)
GPx	Glutationo peroxidase (EC 1.11.1.9)
GR	Glutationo redutase (EC 1.8.1.7)
GRAS	Do inglês “generally recognized as safe” (Geralmente reconhecido como seguro)
GSH	Glutationo
GSH sintetase	Glutationo sintetase (EC 6.3.2.3)
GSSG	Dissulfureto de glutaciono
GST	glutationo-S-transferase (EC 2.5.1.13)
HNE	4-hidroxinonenal
IDH	Isocitrato desidrogenase (EC 1.1.1.41)
LO <sup>•</sup>	Radical alcóxilo
LOO <sup>•</sup>	Radical peróxilo
LOOH	Lipoperóxidos
MDA	Malonodialdeído
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma oxidada
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida
NADH desidrogenase	NADH (ubiquinona) desidrogenase (EC 1.6.5.3)
NADP <sup>+</sup>	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma oxidada
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida
ND	NADH Desidrogenase (EC 1.6.5.3)
NDE 1	NADH Desidrogenase Externa 1 (EC 1.6.5.3)

NDE 2	NADH Desidrogenase Externa 2 (EC 1.6.5.3)
NDI	NADH Desidrogenase Interna (EC 1.6.5.3)
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical anião superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
OPT	o-ftalaldeído
PL	Fosfolípidos
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SOD	Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
TAG	Triacilgliceróis
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tri-cloroacético
TES	Ácido <i>N</i> -tris(hidroximetil)-metil-2-aminoetanosulfónico
TRx px	Tiorredoxina peroxidase (EC 1.11.1.15)
TRx r	Tiorredoxina redutase (EC 1.8.1.9)
YEPD	Meio líquido composto por glucose, extracto de levedura e peptona
YEPD-V	Meio líquido composto por glucose, extracto de levedura, peptona e vanádio
γ-GCS	γ-glutamilcisteína sintetase (EC 6.3.2.2)
γ-GT	γ-glutamil transpeptidase (EC 2.3.2.2)

## Resumo

### **Stress por metais – Distúrbios em *Saccharomyces cerevisiae* ao nível do mitocondrio, retículo endoplasmático e citoplasma expostos ao pentóxido de vanádio**

Ana Paula Silva Conim (2010). **Stress por metais – Distúrbios em *Saccharomyces cerevisiae* ao nível do mitocondrio, retículo endoplasmático e citoplasma expostos ao pentóxido de vanádio**. Tese de mestrado (R. Ferreira e I. Alves-Pereira, orientadores) Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

Este estudo avaliou a resposta de *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741, ao pentóxido de vanádio. Os resultados mostraram que o metal causou inibição do crescimento celular das três estirpes, avaliado pela turbidez do meio, cfu, biomassa e malonoaldeído citoplasmático após 72 h de ensaio. O menor decréscimo das actividades Glutathione redutase e Catalase T citoplasmáticas e da glutathione/dissulfureto de glutathione mitocondrial, na estirpe UE-ME<sub>3</sub> justifica uma melhor sobrevivência desta ao metal. O bloqueio da actividade NADH desidrogenase, assim como, o incremento da actividade NADPH desidrogenase microsomal nas três estirpes, parecem constituir fontes maioritárias de espécies reactivas de oxigénio na resposta ao vanádio. O aumento do conteúdo em ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos mitocondriais e microsomais de células UE-ME<sub>3</sub> expostas ao vanádio, reflectem o aumento da multiplicação celular com modificações membranares que favorecem o desempenho de NADH desidrogenase e NADPH desidrogenase corroborando uma resposta mais adaptativa da estirpe nativa (UE-ME<sub>3</sub>).





## Abstract

### **Stress by metals - Disturbances in *Saccharomyces cerevisiae* at the level of mitochondria, endoplasmic reticulum and cytoplasm exposed to vanadium pentoxide**

Ana Paula Silva Conim (2010). **Stress by metals - Disturbances in *Saccharomyces cerevisiae* at the level of mitochondria, endoplasmic reticulum and cytoplasm exposed to vanadium pentoxide**. Master's thesis (R. Ferreira and I. Alves-Pereira, advisers), Sciences and Technology School, University of Évora, Évora, Portugal

This study evaluated the response of *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit and BY4741 to the vanadium pentoxide. The results showed that the metal caused inhibition of cell growth of three strains, assessed by the turbidity of the medium, cfu, biomass and malondialdehyde level, after 72 h of culture. The lowest decrease in cytoplasmic glutathione reductase and catalase T activities, and mitochondrial glutathione/glutathione disulfide in strain UE-ME<sub>3</sub>, supports it better survival to the metal. The blocking of the NADH dehydrogenase activity and the increase of microsomal NADPH dehydrogenase activity, in all three strains, appears to be sources of reactive oxygen species in the response to vanadium. The increase in mitochondrial and microsomal ergosterol, triacylglycerols and phospholipids contents of UE-ME<sub>3</sub> strain exposed to vanadium, reflect the increase of cellular multiplication with membrane changes that favor the performance of NADH and NADPH dehydrogenases which support a more adaptive response of the UE-ME<sub>3</sub> strain.



## **1. Fundamento teórico**



## 1.1. Vanádio

A poluição do solo e aquíferos por metais pesados, na vizinhança de regiões industriais, tem despertado o interesse da comunidade científica para a selecção de microrganismos resistentes a esses agentes químicos, tendo em conta os mecanismos de interacção metal-microrganismo (Bell, 2004).

O vanádio é um metal de transição que se encontra disperso pela crosta terrestre (~0,02%), possuindo número atómico 23 e peso atómico 51. Pode assumir vários estados de oxidação que vão desde (+2) a (+5) que apresentam colorações diferentes (Figura 1.1), e o estado (+4) é o mais estável. Em solução pode ocorrer uma mistura de estados de oxidação, sendo a mais usual a mistura entre (+4) e (+5). Por outro lado, é descrito na literatura como gerador de ROS (Reger, 1997; Thompson, 2001; Vachirapatama, 2002; Valko, 2006).



**Figura 1.1: Ilustração das colorações que o vanádio pode assumir consoante o seu estado de oxidação.** Roxo (+2); Verde (+3); Azul (+4); Amarelo (+5). (<http://en.wikipedia.org/wiki/Vanadium>, acedido dia 23 de Setembro de 2010)

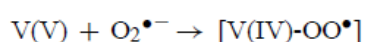
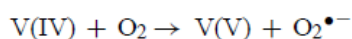
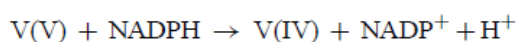
O vanádio é utilizado no endurecimento de ligas metálicas, como constituinte de produtos cerâmicos, corantes e fitofármacos, podendo também ser encontrado em níveis elevados nos combustíveis fósseis. Pode acumular-se no solo e em águas superficiais e subterrâneas, devido à queima de derivados do petróleo. Em algumas zonas industriais, os níveis ambientais de vanádio tem aumentado para valores muito superiores aos detectados na crosta terrestre e aos de outros metais pesados, como a prata, selénio, cádmio e mercúrio, constituindo por essa razão motivo de preocupação ao nível de saúde ambiental. A concentração de vanádio na água potável pode variar entre 0,2 a 100 µg/L, com os valores típicos a oscilar entre 1 a 6 µg/L. A concentração do vanádio no crude é altamente variável, dependendo da sua fonte e varia entre 0,02 a 1180 ppm (Moskalyk, 2003; Bell, 2004).

O vanádio em quantidades vestigiais (µg/L) é um elemento essencial para o crescimento celular normal tendo sido utilizado na terapia do cancro, diabetes e HIV.

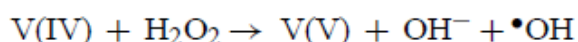
Contudo, a concentração elevada (mg/L), o vanádio é tóxico para plantas e animais, em particular quando se encontra no estado de oxidação V (+5) (Mandiwana, 2010).

No plasma sanguíneo o vanádio (+5) é rapidamente reduzido a vanádio (+4) por antioxidantes plasmáticos não-enzimáticos, como o NADPH e o ascorbato (Valko, 2006).

No interior celular podem ocorrer reacções que levam à formação de radical peroxovanadilo (V(IV)–OO•) e hidroperóxido de vanadilo (V(IV)–OH•).



O radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) então gerado pode ser posteriormente convertido em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) pelo enzima superóxido dismutase (SOD). Contudo alguns autores tem proposto que as ROS resultantes da reacção entre o vanádio (+4) e lipoperóxidos, via reacções de Fenton, desempenham, em condições fisiológicas, um papel relevante na indução de danos celulares pelo vanádio (+5).



A utilização de compostos de vanádio como inibidores de tirosinafosfatases em estudos de sinalização celular tem também demonstrado que este elemento pode induzir *stress* oxidativo (Valko, 2006).

Em ambiente oxidante o vanádio existe como monómero hidratado de vanadato,  $HVO_4^{2-}$  ou  $H_2VO_4^-$ , na ordem dos micromolar, a pH neutro, enquanto na presença de agentes redutores intracelulares ou extracelulares, como por exemplo, o glutatono, o anião é reduzido a catião vanadilo ( $VO_2^+$ ). A biorredução de V (+5) a V (+4) pelo glutatono ou por enzimas do retículo endoplasmático, gerador de radicais hidroxilo, assim como, por flavoenzimas dependentes NADH parece regular várias acções celulares de compostos de vanádio, como os seus efeitos citotóxicos e morfológicos em diferentes tipos de células (Evangelou, 2002).

Estudos em roedores tem revelado que a indução de ROS pode estar relacionada com a desintoxicação do vanadato, que na presença de NADH gera radical hidroxilo *via* reacções de Fenton e outras espécies reactivas como o  $H_2O_2$ , implicadas na peroxidação lipídica. No entanto, a capacidade do vanadato para induzir *stress* oxidativo em organismos vivos é controversa. O vanádio actua como um espermicida, mutagénico, mas os compostos de vanádio também podem aumentar o transporte de glucose, e desempenhar actividade mimética da insulina e ser utilizado no tratamento da diabetes. Além disso, o vanádio induz

a apoptose em células tumorais humanas podendo portanto, incorporar uma nova classe de fármacos anticancerígenas citotóxicos (Mannazzu, 2000).

O vanádio como metal de transição pode assumir fisiologicamente diversos estados de oxidação que podem variar desde formas catiónicas até aniónicas, no intervalo de pH que pode variar desde 2 até 8. O equilíbrio redox do vanádio, *in vivo*, é mediado pelo dióxigénio, acidez e presença de agentes redutores endógenos, como o ácido ascórbico, glutationo e catecolaminas. Apesar de o vanádio ser proposto como um regulador do metabolismo celular, *in vivo*, particularmente na inibição da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, ainda não lhe foi atribuída função bioquímica em mamíferos (Thompson, 2001).

Os compostos de óxido de vanádio, como o pentóxido de vanádio, assumem elevada importância em fisiologia celular pois têm sido testados como inibidores de processos celulares *in vitro*. A sua reactividade química envolve o estabelecimento de uma série de equilíbrios complexos dependentes de pH e da concentração. O vanadato (+5) pode também agir como um aceitador de electrões em reacções de oxidação-redução intracelulares. O vanadato pode ser convertido em vanadilo (+4) pelo glutationo e outros compostos celulares. A adição de vanádio a sistemas celulares intactos pode então levar à formação de vanadilo intracelular que parece estimular o transporte de fosfato, a mitogénese, a síntese de DNA e outros processos metabólicos (Willsky, 1985; Mannazzu, 2001).

O vanádio encontra-se presente nos tecidos de mamíferos no intervalo de concentração que varia entre 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-6</sup> M, intervalo de concentração onde o vanádio poderia causar inibição da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, *in vivo*, facto que parece confirmar a importância metabólica do metal (Willsky, 1985).

A levedura *S. cerevisiae* responde à presença de concentrações tóxicas de cobre por vários mecanismos de defesa, como o incremento da síntese de metalotioneínas, acção de enzimas antioxidantes e activação das funções do vacúolo. Da mesma forma, a desintoxicação do vanadato parece requerer a activação de diferentes mecanismos. Na levedura *Hansenula polymorpha*, tem sido sugerido que o vanadato é reduzido à sua forma menos tóxica, o vanadilo que pode ser sequestrado pelo vacúolo. De facto, a resposta ao vanádio por esta levedura activa uma via de desintoxicação específica, provavelmente mediada por peroxidases, que são capazes de proteger as células de leveduras contra os danos oxidativos induzidos pelo vanádio (Mannazzu, 2000; Mannazzu, 2001).

O vanádio pode afectar a respiração mitocondrial, interagindo com a H<sup>+</sup>ATPase mitocondrial e sub-mitocondrial de *S. cerevisiae*, actividade que é inibida por 5,5 µM e 55 µM de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, respectivamente (Henderson, 1989<sup>a</sup>), resposta que pode dever-se ao facto do vanadato possuir uma estrutura semelhante à do fosfato (Henderson, 1989<sup>b</sup>). No entanto, a levedura é capaz de sobreviver e crescer, apesar da cadeia respiratória não se encontrar

funcional, o que torna este eucariota um modelo importante para o estudos sobre o papel do mitocondrio e na investigação de substâncias tóxicas (Henderson, 1989<sup>b</sup>).

A levedura *S. cerevisiae* é capaz de activar mecanismos de desintoxicação que podem funcionar de forma eficiente em concentração baixa de vanádio. Nesses casos, após entrada na célula, o vanadato é reduzido a vanadilo, e excretado. Contudo, para concentrações elevadas, a taxa de vanadato ultrapassa o afluxo da redução do vanadato, e é acumulado intracelularmente, levando à formação de compostos de vanádio tóxicos, com elevado peso molecular que inibem o crescimento celular (Willsky, 1985; Mannazzu, 2001).

Bisconti e seus colaboradores observaram três estirpes diferentes de *S. cerevisiae* que mostravam níveis de resistência diferentes ao vanádio. Apenas uma delas era mais resistente e foi capaz de reduzir o vanadato, enquanto as outras duas acumulam o vanádio não sendo capazes de se desintoxicarem do metal. Assim, a sua sobrevivência na presença de elevada concentração de vanádio, no meio de crescimento, parece depender da habilidade das células para converter o vanadato a vanadilo (Bisconti, 1997; Mannazzu, 2001).

## 1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular pertencente à família Ascomycetes considerado como óptimo modelo eucariota para estudos de biologia molecular e celular. O crescimento e divisão celular das leveduras podem ser controlados de modo eficaz ajustando-se a diferentes condições ambientais. À partida, seria de esperar que este organismo unicelular fosse considerado um sistema modelo “fraco” para estudos de envelhecimento, uma vez que a mitose, leva à geração de duas células filhas idênticas, facto que pode levar à imortalidade da população ou, por outro lado à sua extinção. No entanto, esse risco não se coloca pois *S. cerevisiae* sofre divisão celular assimétrica, ao contrário dos procariotas e da *Schizosaccharomyces pombe*, ou seja, a célula mãe é distinta da célula filha (Muller, 2007).

As leveduras estão também bem definidas geneticamente pois o seu genoma está sequenciado e pode ser acedido facilmente através de bases de dados. Além disso, é um organismo que pode ser modificado geneticamente, admitindo o mapeamento ou mutações de genes. Devido a estas vantagens, tem se tornado o modelo mais utilizado em estudos de medicina. Como exemplo, estudos realizados com leveduras contribuíram para o conhecimento da divisão celular em eucariotas e a sua regulação, incluindo os distúrbios causados pelo cancro. Actualmente, as leveduras mantêm um papel importante, como sistemas modelo, em estudos fundamentais de processos patológicos humanos. De facto,



estudos recentes revelam a existência em leveduras de vias de sinal reguladoras de apoptose que englobam muitos dos eventos cruciais que ocorrem em células de mamíferos (Mager, 2005).

A comparação entre o genoma humano e o de levedura, descritos em 1997, revelaram que 30% dos genes conhecidos envolvidos em patologias humanas encontram-se expressos em genes homólogos funcionais nas leveduras. Além disso, centenas de genes de leveduras possuem uma ligação aos genes relacionados com patologias humanas, correspondendo a maioria desses genes a componentes chave envolvidos em vias de sinalização ou processos metabólicos específicos. Embora às vezes seja difícil avaliar a preservação funcional entre os genes de levedura e os genes de patologias humanas, os estudos com leveduras podem fornecer informação relevante acerca da função biológica desses genes humanos. Desde que se tornou possível a comparação do genoma humano com o de leveduras que tem aumentado a identificação de semelhanças entre estes seres vivos (Mager, 2005).

Tal como as células de mamíferos, as células de *S. cerevisiae* possuem um potencial replicativo finito, ou seja, cada célula apenas é capaz de atingir um número limitado de divisões, antes de entrar em senescência, e morrer (Zandycke, 2002).

Quando culturas de levedura crescem em meio rico em glucose, como o meio YPD (2 % glucose) observam-se várias fases de crescimento distintas; fase lag, log ou exponencial, estacionária e de declínio (Werner-Washburne, 1993; Prescott, 2005).

Culturas de levedura em fase estacionária parecem constituir outro modelo interessante em estudos de envelhecimento. A fase estacionária é identificada como o ciclo da cultura de microrganismos onde não se observa aumento do número de células na cultura. As células em fase estacionária são fisiológica, bioquímica e morfológicamente distintas das células em fase exponencial. Quando as células de levedura entram em fase estacionária, a divisão celular é interrompida e o metabolismo celular abranda. As células são capazes de sobreviver nesta fase durante semanas ou meses sem nutrientes, tornando-se mais termotolerantes e mais resistentes ao *stress* oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Werner-Washburne, 1993; Jakubowski, 2000; Kusch, 2008).

Quando ocorre a escassez de um nutriente essencial no meio, as células de *S. cerevisiae* cessam a divisão mitótica e permanecem na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular mitótico. Essas células adquirem posteriormente uma variedade de características que definem a fase estacionária de crescimento. Estas alterações incluem uma redução drástica na taxa de crescimento total, acumulação de triacilgliceróis, glúcidos, aumento da resistência a variações de *stress* no ambiente, incluindo choque térmico, espessamento da parede celular, e maior capacidade de sobrevivência à escassez de nutrientes. Ocorre um conjunto de alterações idênticas quando ocorre falta de fonte de carbono, azoto ou fosfato. No

entanto, ainda não está claro se essa fase de repouso é idêntica em cada um desses casos. Em particular, tem sido sugerido que a verdadeira fase estacionária ocorre quando existe escassez da fonte de carbono. Em qualquer dos casos, as diferenças acima mencionados entre as fases  $G_1$  e a estacionária sugerem que esta fase de repouso é distinta da fase de crescimento (Herman, 2002).

Curiosamente, o tempo de vida replicativa de células individuais decresce quando as leveduras continuam por tempo prolongado em culturas estacionárias, um fenómeno que lembra o que se observa nos fibroblastos humanos. A teoria dos radicais livres associados ao envelhecimento postula que os danos oxidativos constituem uma causa importante do envelhecimento celular (Jakubowski, 2000).

### 1.3. Espécies Reactivas de Oxigénio

O aparecimento do dióxigénio ( $O_2$ ) na atmosfera possibilitou a geração do metabolismo respiratório e de sistemas geradores de energia, mas também levou a que ocorresse a formação de espécies reactivas de oxigénio nas células como sub-produtos (Temple, 2005; Perrone, 2008).

A química do  $O_2$  abrange uma grande variedade de reacções, a maioria delas altamente benéfica para os organismos em que ocorrem, apesar de algumas também poderem ser deletérias. O  $O_2$  é um poderoso agente oxidante, que deve ser disponibilizado em contínuo para as células respirarem, também é usado como fonte de átomos de oxigénio numa variedade de reacções biosintéticas catalisadas por enzimas. O mesmo poder oxidante do  $O_2$  é a base da respiração, no entanto, também faz com que seja simultaneamente um agente de *stress* oxidativo tóxico (Valentine, 1998).

A molécula de  $O_2$  possui dois electrões desemparelhados na sua forma mais estável, tornando-a um diradical, altamente reactivo e que pode ser parcialmente reduzida para gerar vários agentes quimicamente reactivos, denominados por espécies reactivas de oxigénio (ROS), como o radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) (Figura 1.2). Além destas entidades altamente reactivas, tanto o  $H_2O_2$  como o radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) também estão incluídos nas ROS podendo levar à produção de mais espécies reactivas, particularmente na presença de iões metálicos. Essas espécies são muito prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, as proteínas e os lípidos, e são capazes de afectar a homeostase redutora da célula (Jamieson, 1998; Valentine, 1998; Temple, 2005; Perrone, 2008).

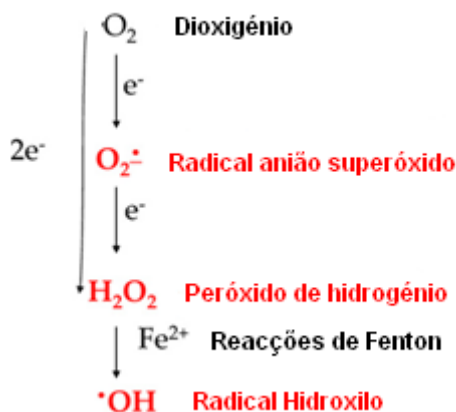


Figura 1.2: Interconversão das espécies reativas de oxigénio (adaptado de Bartosz, 2009)

### 1.3.1. Formação de ROS

Em condições fisiológicas, a principal fonte de ROS resulta da libertação de electrões pela cadeia respiratória durante a redução do O<sub>2</sub> a água, gerando o radical anião superóxido como uma consequência normal da respiração aeróbia (Sedensky, 2006). Outras fontes de ROS incluem o metabolismo que assiste à  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos ou a resposta a xenobióticos mediada pelo citocromo P450, do retículo endoplasmático (Valko, 2006). Outra fonte notável de ROS na membrana plasmática é a NADPH oxidase, que está associada à sinalização celular (Hernández-García, 2010). O radical anião superóxido não é tão reactivo como o radical hidroxilo, mas consegue reagir directamente com algumas proteínas. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é gerado nas células durante a desintoxicação do anião superóxido, por uma reacção catalisada pela SOD, podendo ser também gerado pela  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos no peroxissoma, mediada por várias oxidases, mas também durante o processo de *foldíng* de proteínas no retículo endoplasmático. Apesar de o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conseguir atravessar a maioria das membranas biológicas e ser relativamente inerte, produz efeitos deletérios quando convertido em radical hidroxilo que é extremamente reactivo (Valentine, 1998; Jamieson, 1998; Temple, 2005; Herrero, 2008; Perrone, 2008).

O radical hidroxilo é gerado a partir da combinação do anião superóxido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através de reacções de Fenton Haber-Weiss, catalisadas por iões metálicos como o Fe<sup>2+</sup>, que é oxidado no processo. O ião ferroso (Fe<sup>2+</sup>) reage com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ião OH<sup>-</sup>, formando o radical hidroxilo e Fe<sup>3+</sup>, que pode ser reduzido de novo a Fe<sup>2+</sup> pelo ião OH<sup>-</sup>, reiniciando o processo. O radical hidroxilo é extremamente reactivo e reage indiscriminadamente com a maioria dos metabolitos e macromoléculas, em muitos casos gerando outros radicais no processo. Os mecanismos envolvidos na homeostase de iões metálicos, iões ferro e cobre,

são um componente importante das defesas celulares para minimizar a geração de ROS (Valentine, 1998; Temple, 2005; Perrone, 2008).

As ROS também podem ser geradas pela exposição das células a radiação ionizante, produtos químicos presentes no ambiente ou através da exposição a metais pesados. Dada a natureza ubíqua das ROS, não é de admirar que a maioria dos organismos tenha desenvolvido meios para proteger os seus componentes celulares contra os oxidantes (Jamieson, 1998).

Além disso, também existem sistemas especializados que geram como subprodutos aniões superóxido e outras ROS que são usados nos sistemas de defesa contra agentes patogénicos. Como exemplo, o sistema da NADPH oxidase que se encontra nos leucócitos, que catalisa a redução do dióxigénio através da NADPH formando o anião superóxido (Valentine, 1998).

### 1.3.2. Stress oxidativo

O termo *stress oxidativo* é usualmente utilizado para designar o desequilíbrio entre a concentração das espécies reactivas de oxigénio (ROS) e os mecanismos de defesa anti-oxidantes existentes na célula, que leva à ocorrência de danos a nível celular. Esse desequilíbrio desempenha um papel crucial em várias patologias. Entre elas inclui-se o cancro, doenças cardiovasculares, síndrome de Down, artrite reumatóide, doenças auto-imunitárias e SIDA. Os danos oxidativos estão associados a factores importantes de mutagénese, cancerigénese, senescência e patologias relacionadas com a idade como a doença de Parkinson e Alzheimer (Dotan, 2004; Temple, 2005; Cipak, 2006).

Os organismos vivos desenvolveram muitas formas de reparar ou evitar essas consequências deletérias. As células respondem à alteração dos níveis de *stress oxidativo* através da indução ou supressão de vários genes que vão desde os que codificam os sistemas antioxidantes aos componentes da cadeia respiratória. Também tem sido demonstrado que as ROS funcionam como mensageiros secundários em vias de sinalização nos organismos superiores. Assim a célula pode responder a estímulos que geram situações pontuais de *stress oxidativo*, gerando ROS que difunde até um alvo, reage e dá-se a transdução de sinal (Valentine, 1998).

As *S. cerevisiae* respondem ao *stress oxidativo* de diversas formas. A níveis muito baixas de ROS as células podem adaptar-se e tornarem-se mais resistentes a uma subsequente exposição letal, a níveis elevados diminuem a divisão celular e induzem os sistemas antioxidantes, a menos que entrem em condições crónicas de *stress oxidativo*

onde uma proporção de células da população morre, inicialmente por apoptose, ou em condições extremas por necrose (Temple, 2005; Perrone, 2008).

Tem sido demonstrado que as células de levedura envelhecidas cronologicamente ou replicativamente acumulam ROS e sofrem morte celular por apoptose, sugerindo que os mecanismos de defesa anti-*stress* oxidativo desempenham um papel relevante na regulação da apoptose e do envelhecimento celular (Perrone, 2008).

Pensa-se que o envelhecimento celular pode resultar do aumento de danos oxidativos em lípidos, proteínas ou DNA, ou alternativamente, do efeito do *stress* oxidativo no controlo de genes que regulam os processos de desenvolvimento, incluindo a diferenciação celular e senescência (Rikans, 1997).

Existem vários estudos que têm envolvido a produção de ROS nas vias de sinalização da apoptose, pelo que torna-se interessante especular a sua ligação com o mitocondrio, a maior fonte de ROS em células eucarióticas. Sabe-se que o mitocondrio desempenha um papel central na apoptose, através da libertação de citocromo c para o citoplasma devido a activação de proteases, como as caspases-3, como parte da via apoptótica. Além disso, as ROS desempenham um papel na modulação da porosidade mitocondrial, participantes na transferência do sinal apoptótico (Valentine, 1998).

A célula pode entrar em *stress* oxidativo quando o fluxo de electrões ao nível da cadeia respiratória é perturbado, sendo geradas ROS por inibidores específicos, por concentração limitante de ADP, ou ainda pela presença de xenobióticos que aceitam electrões da cadeia respiratória e os transferem para o O<sub>2</sub>, estimulando a formação de radical superóxido sem inibir a cadeia respiratória (Halliwell, 2007).

Os recentes avanços na análise genómica têm demonstrado que existem muitos genes envolvidos nestas respostas fisiológicas. Por exemplo, análise do DNA por *microarray* mostra que a exposição de células a alterações ambientais, como calor, ROS, *stress* osmótico e salino, induzem ou reprimem vários genes (Temple, 2005).

### 1.3.3. NADH desidrogenase

A actividade NADH (ubiquinona) desidrogenase, também designada por coenzima Q redutase, Complexo I desidrogenase, ou NADH-Coenzima Q redutase refere-se à reacção (Expasy, [www.expasy.org](http://www.expasy.org)):



Tal como em outros eucariotas, a degradação de glúcidos pela *S. cerevisiae* leva à redução do NAD<sup>+</sup> a NADH, em distintos compartimentos celulares. O NADH citoplasmático é produzido pelo enzima glicolítico gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Na matriz mitocondrial, o NADH é formado pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos e pelo complexo piruvato desidrogenase. Em condições anaeróbias, a degradação da glucose ocorre exclusivamente pela via fermentativa alcoólica. O NADH adicional originado pela produção de biomassa pode ser re-oxidado pela produção de glicerol. Em condições aeróbias, a produção de glicerol não é necessária, devido a re-oxidação do NADH citoplasmático poder ser acoplada à respiração mitocondrial. Ao contrário da membrana interna mitocondrial, a membrana externa é permeável ao NADH (Luttik, 1998; Overkamp, 2000).

A NADH desidrogenase mitocondrial integrada na cadeia respiratória, constitui o principal local aceitador de electrões e, em mitocondrios de mamíferos, é conhecida por ser sensível à rotenona. O complexo I de mamíferos é constituído por 46 subunidades, e sete das quais são codificadas pelo genoma mitocondrial (Park, 2007).

A *S. cerevisiae* não possui complexo I, mas possui três NADH desidrogenases insensíveis à rotenona localizadas no espaço inter-membranar mitocondrial, uma NADH desidrogenase interna e duas externas. O NADH gerado na matriz mitocondrial é oxidado pela NADH desidrogenase interna (NDI 1), que se encontra localizado na membrana mitocondrial interna, com o seu centro activo virado para a matriz mitocondrial. Este enzima tem sido apontado como um regulador importante do ambiente redutor mitocondrial criado pelo NADH proveniente do ciclo do citrato e da oxidação do etanol pelo desvio metabólico acetaldeído/etanol. No mitocondrio das leveduras, ao contrário dos mamíferos, o NADH citoplasmático é oxidado directamente, e não está associado ao transporte de protões (Overkamp, 2000; Fang, 2003; Herrero, 2008).

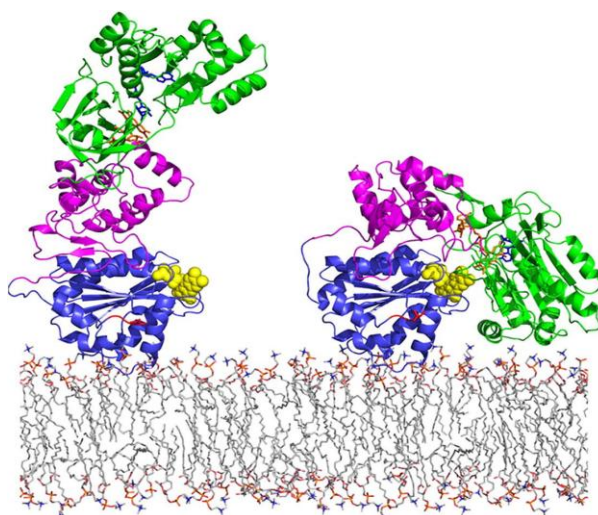
As duas NADH desidrogenases externas (NDE1 e NDE2) encontram-se localizadas na membrana mitocondrial interna com os seus centros activos virados para o espaço inter-membranar mitocondrial. Como a membrana interna é impermeável ao NADH, alguns autores tem-lhe atribuído o papel de oxidar o NADH citoplasmático proveniente da glicólise que também pode ser oxidado pela cadeia respiratória via glicerol-3-fosfato desidrogenase (Overkamp, 2000; Fang, 2003; Herrero, 2008).

Do ponto de vista estrutural, estas enzimas são muito mais simples que o complexo I. Por exemplo, a NDI contém uma subunidade simples de 53 kDa codificada pelo DNA nuclear e contém uma ligação não-covalente com FAD. A subunidade é sintetizada nos ribossomas citoplasmáticos e importada para o mitocondrio. O FAD e os centros de ferro e enxofre são os seus principais cofactores. Estas desidrogenases diferem do complexo I dos mamíferos, na insensibilidade à rotenona e na ausência de um centro redox ferro-enxofre (Small, 1998; Velázquez, 2001).

Ao contrário dos mitocondrios de fungos e plantas, os mitocondrios de mamíferos não possuem um NADH desidrogenase externo, e portanto, dependem de mecanismos transportadores para acoplar a oxidação do NADH citoplasmático com a NDI. A existência de NADH desidrogenases externas em leveduras está correlacionado com a ausência do transportador malato-aspartato, que ocorre em mamíferos. Contudo, os enzimas-chave para dois sistemas alternativos, o glicerol-3-fosfato desidrogenase e o transportador etanol-aldeído, foram ambos detectados em *S. cerevisiae* (Luttik, 1998; Overkamp, 2000).

#### 1.3.4. NADPH citocromo P450 desidrogenase

A NADPH citocromo P450 desidrogenase (CPR) (~78 kDa) é uma flavoproteína de membrana localizada na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático (Expasy, [www.expasy.org](http://www.expasy.org)) (Figura 1.3.), e tem evoluído como resultado da fusão de duas flavoproteínas diferentes, permitindo-lhe ligar uma molécula de FAD e FMN. Como se pode deduzir através do nome, *in vivo* os principais pares redox da CPR são os citocromos P450, estes constituem uma família multi-enzimática de mono-oxigenases que catalisam hidroxilações régio- e estéreo específicas de uma grande variedade de substratos (Portal, 2008; Laursen, 2010).



**Figura 1.3: Modelo computacional que ilustra o enzima CPR em conformação aberta e fechada numa bicamada lipídica.** O domínio FMN encontra-se representado a azul, o domínio de ligação a púrpura, os domínios de ligação ao FAD e NADPH a verde, o coenzima FMN como esferas amarelas, o coenzima FAD a laranja (adaptado de Laursen, 2010)

Os citocromos P450 são capazes de converter xenobióticos em metabolitos polares inertes, ou de activá-los para se tornarem espécies reactivas capazes de causar danos no DNA, proteínas e lípidos (Puntarulo, 1998).

O mecanismo catalítico dos citocromos P450 é baseado na clivagem heterolítica do  $O_2$  por um processo em que várias etapas são de transferência de electrões da CPR. Os electrões são transferidos do NADPH através dos co-enzimas FAD e FMN da CPR para o átomo de Ferro do grupo prostético hemo dos citocromos P450 (Figura 1.4). A CPR é capaz de transferir electrões para outras proteínas redox do citocromo P450 como o citocromo c, citocromo  $b_5$ , hemo oxigenase, assim como para o sistema de alongação dos ácidos gordos. A geração de radicais dentro do centro activo dos citocromos P450 é responsável pelas suas propriedades catalíticas invulgares, e são geradas pequenas quantidades de  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$ , como subprodutos do ciclo catalítico normal dos P450. Para serem cataliticamente activos os citocromos P450 microsossomais exigem uma fonte de electrões, que são fornecidos pela CPR (Puntarulo, 1998; Portal, 2008; Laursen, 2010).

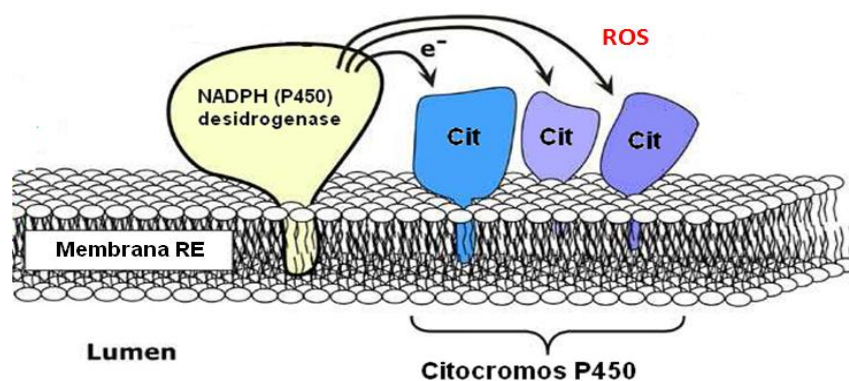


Figura 1.4: Diagrama representativo da transferência de electrões no retículo endoplasmático (adaptado de <http://www.bio.ilstu.edu/Edwards/Projects/P450.shtml>, acedido dia 23 de Setembro de 2010).

Todas as CPRs apresentam uma sequência de aminoácidos semelhante que varia entre os 30 % a 90 % entre as bactérias, leveduras, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados, sendo os domínios de ligação o FMN, FAD e NADPH as regiões mais conservadas (Portal, 2008).

#### 1.4. Danos causados pelas espécies reactivas de oxigénio

As ROS podem causar danos numa grande variedade de moléculas, incluído ácidos gordos, proteínas e lípidos, o que torna difícil determinar quais os eventos que levam à perda de viabilidade celular. Os danos causados pelas ROS podem levar à fragmentação de proteínas, aumentando a proteólise e, no caso dos radicais hidroxilo reduzir os resíduos de



aminoácidos, especialmente os que possuem anéis aromáticos, como a fenilalanina, o triptofano e a tirosina, e os sulfurados como a cisteína. Os hidroperóxidos reactivos então formados podem decompor-se levando à formação de radicais livres causando modificação de aminoácidos no esqueleto de proteínas, fragmentação, *cross-linking* e *unfolding*. Os derivados hidroxilados são gerados a partir de aminoácidos alifáticos e a oxidação de resíduos aromáticos podem produzir fenoxirradicais reactivos. As ROS podem danificar os ácidos nucleicos que têm sido implicados na mutagénese e cancerigénese (Perrone, 2008).

O radical anião superóxido e o  $H_2O_2$  não reagem directamente com o DNA, mas são importantes na geração do radical hidroxilo catalisada por metais. O radical hidroxilo reage com as bases do DNA formando vários produtos característicos, entre os quais a 8-hidroxi guanina, podendo reagir de igual forma com a desoxirribose, através da sequestração de um átomo de hidrogénio, que geralmente leva à ruptura da cadeia de DNA tendo como principais produtos a 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina e a 5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina (Richter, 1997; Perrone, 2008).

Estudos químicos da oxidação de proteínas mediada por radicais têm demonstrado que ocorre modificação oxidativa das cadeias laterais, clivagem do esqueleto e dimerização proteína-proteína. As cadeias laterais que contêm enxofre são particularmente vulneráveis à oxidação do enxofre, mas a maioria das outras vias oxidativas levam à formação de aldeídos e cetonas, que são muito comuns na detecção de proteínas (Valentine, 1998; Perrone, 2008).

Os danos no DNA ou indução de *stress* replicativo através de mutações que afectam a iniciação da replicação, tem sido demonstrado que leva à ocorrência de apoptose em *S. cerevisiae* e é acompanhado pela geração de ROS (Perrone, 2008).

Os resíduos acilo dos ácidos gordos insaturados nas membranas são o maior alvo do radical hidroxilo e anião superóxido, iniciando a peroxidação lipídica com a formação de radical peróxilo ( $LOO\bullet$ ) e lipoperóxidos (LOOH) (Cipak, 2006).

A peroxidação lipídica não só ameaça a integridade e função das membranas e das proteínas de membrana, como também gera uma variedade de produtos, muitos dos quais electrófilos reactivos. Envolve ainda, a oxidação de ácidos gordos polinsaturados através de processos auto-catalíticos, levando à formação de lipoperóxidos, que sofrem fragmentação, gerando uma variedade de produtos reactivos, como epóxidos, aldeídos e cetonas. Alguns desses produtos são extremamente reactivos e causam danos devido à toxicidade e mesmo mutações (Valentine, 1998; Marnett, 1999; Costa, 2001; Perrone, 2008).

Sabe-se que a geração de ROS induzida por metais, não causa apenas danos no DNA, mas também danifica outros componentes celulares como os resíduos de ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos, que são extremamente sensíveis a oxidações (Valko, 2006).

Embora a *S. cerevisiae* seja um bom modelo eucariota para estudar muitos aspectos da resposta ao *stress* oxidativo, são incapazes de sintetizar ácidos gordos polinsaturados, devido à falta de enzimas capazes de introduzir mais do que uma única ligação dupla nos ácidos gordos, sendo estes incorporados nas membranas quando se encontram presentes no meio de cultura. Dessa forma a peroxidação lipídica depende da quantidade de ácidos gordos presentes no meio de cultura. Apesar de os principais produtos gerados na peroxidação lipídica em leveduras não serem semelhantes aos encontrados nas células de mamíferos sob iguais condições de *stress* oxidativo, promove meios genéticos e bioquímicos para controlar os efeitos deletérios da peroxidação lipídica, assim como, os mecanismos de defesa antioxidante (Marnett, 1999; Costa, 2001; Cipak, 2006; Valko, 2006).

Os lipoperóxidos são os produtos mais simples da peroxidação lipídica e são relativamente estáveis na ausência de metais. Contudo, os complexos metálicos ou metaloproteínas são abundantes nas células e rapidamente reduzem os lipoperóxidos em radicais alcoilos (LO<sup>•</sup>) (Marnett, 1999; Dotan, 2004; Valko, 2006).

Os produtos resultantes da degradação e decomposição são utilizados para avaliar o nível de *stress* oxidativo, incluindo lipoperóxidos, assim como os produtos finais o malonodialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE). O MDA é utilizado desde há muito tempo como um biomarcador da peroxidação lipídica, devido à facilidade com que reage com o ácido tiobarbitúrico, formando um cromóforo de cor intensa (Marnett, 1999; Dotan, 2004; Valko, 2006).

Muitos dos compostos originados reagem com as proteínas e o DNA produzindo efeitos tóxicos e mutagénicos. No entanto o MDA parece ser o produto mais mutagénico da peroxidação lipídica, enquanto que o HNE é o produto mais tóxico (Marnett, 1999; Valko, 2006).

### **1.5. Sistemas de defesa antioxidante**

As células desenvolveram mecanismos de defesa enzimática como os CAT T e CAT A, SOD, G6PD, GR, GPx, TRx px e TRx r e não-enzimáticos como o glutatono e o ascorbato, contra as ROS. Os sistemas não-enzimáticos consistem em moléculas de baixo peso molecular que são solúveis em meio aquoso, e geralmente, actuam como sequestradores de radicais, sendo oxidados pelas ROS que assim removem os pró-oxidantes da solução. Nas células de *S. cerevisiae*, um grupo de enzimas actua directamente como desintoxicantes de ROS, enquanto um segundo grupo actua como regulador redox de proteínas e tióis ajudando a manter o ambiente redutor da célula. Além disso, os sistemas enzimáticos com actividades bioquímicas idênticas podem operar em

paralelo em diferentes compartimentos celulares, como o citoplasma e o mitocondrio (Jamieson, 1998; França, 2007; Herrero, 2008).

Provavelmente um dos mecanismos de defesa não-enzimático mais conhecido é o glutatióno (GSH), um tripéptido que actua como um sequestrador de ROS com um grupo sulfidrílo redutor que reage com os pró-oxidantes e converte-se em dissulfureto de glutatióno (GSSG). A função antioxidante do GSH depende, principalmente, do seu papel como componente de um mecanismo enzimático que as células desenvolveram contra as ROS, que consiste no glutatióno peroxidase e glutatióno redutase (Jamieson, 1998; Pastore, 2003; Dalton, 2004).

Tem sido sugerido que o GSH, ao contrário das catalases, representa um sistema de defesa primária para a desintoxicação de  $H_2O_2$  na célula. No entanto, a actividade catalase é indispensável na ausência de GSH (Zandycke, 2002).

Em condições normais de crescimento, na presença de dioxigénio, glucose e temperatura de crescimento a  $30^\circ C$ , os níveis de ROS no citoplasma das leveduras são extremamente baixos. Sob essas condições a forma oxidada do glutatióno, dissulfureto de glutatióno (GSSG), também se encontra em níveis baixos, enquanto que os níveis de GSH são superiores (López-Mirabal, 2008)

O glutatióno é um tripéptido, composto por glutamato, cisteína e glicina ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) (Figura 1.5.), presente em todos os tecidos de mamíferos, especialmente, em concentrações elevadas no fígado. Pode ser encontrado na forma tiol-reduzida (GSH) ou na forma oxidada, como dissulfureto de glutatióno (GSSG). A forma predominante é o GSH, com concentração na ordem do mmol (1 – 10 mM) na maioria das células, enquanto que o conteúdo em GSSG é inferior a 1% de GSH. As células eucariotas possuem três reservatórios de GSH; cerca de 90% no citoplasma, 10% no mitocondrio e uma pequena percentagem no retículo endoplasmático (Lu, 2009; Dalton, 2004).

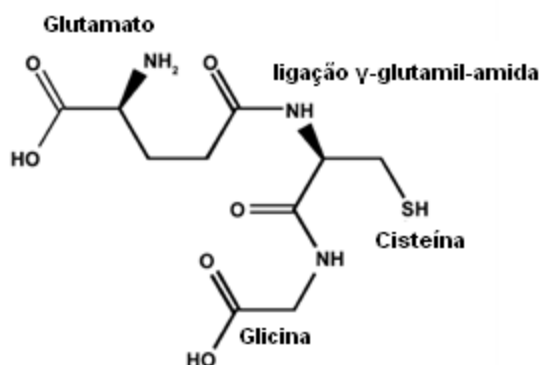


Figura 1.5: Representação esquemática da estrutura química do Glutatióno (GSH). (adaptado Dalton, 2004).

O GSH apresenta uma massa molecular baixa e desempenha um papel importante em muitos processos celulares, incluindo a protecção das células contra agentes cancerígenos, xenobióticos, radiação e contra as ROS. Desempenha também funções de catálise, no metabolismo e no transporte, participa em reacções que envolvem a síntese de proteínas e ácidos nucleicos e nas de desintoxicação de radicais livres e peróxidos. A molécula de GSH que pode formar conjugados com uma variedade de compostos de origem endógena e exógena é cofactor de diversos enzimas (Meister, 1988; Grant, 1996; Dalton, 2004; Perricone, 2009).

O GSH é sintetizado através de duas reacções enzimáticas sucessivas, dependentes de ATP, sendo a reacção retro-inibida pelo próprio GSH. A primeira reacção acopla o glutamato e a cisteína, sendo catalisada pela  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase, resultando na formação da  $\gamma$ -glutamilcisteína. Na segunda reacção a glutathione sintetase catalisa a ligação da glicina ao dipéptido formado. Este mecanismo de síntese tem duas consequências: primeiro, é independente do mRNA, e em segundo, o resíduo de ácido glutâmico liga-se numa ligação péptidica não usual do  $\gamma$ -C ao resíduo de cisteína, que pensa-se proteger o GSH de clivagens proteolíticas (Meister, 1988; Grant, 1996; Dalton, 2004; Lu, 2009).

O GSH não é um tripéptido comum, pois a reacção catalisada pela  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase forma uma ligação amida única entre o carbono- $\gamma$  da cadeia lateral do glutamato e o grupo amina da cisteína, resultando numa ligação  $\gamma$ -glutamilo. Como consequência, o GSH não pode ser fraccionado pelas peptidases no interior da célula; no entanto, é transportado através da membrana plasmática, onde é metabolizado pela  $\gamma$ -glutamil transpeptidase. A  $\gamma$ -glutamil transpeptidase é um enzima que se encontra na superfície externa de algumas membranas celulares, que catalisa a clivagem da ligação  $\gamma$ -glutamilo entre o glutamato e a cisteína, com consumo de ATP, transferindo o resíduo  $\gamma$ -glutamilo para moléculas aceitadoras, como aminoácidos, dipéptidos, GSH e H<sub>2</sub>O. Esta reacção também forma cisteinilglicina que é clivada por dipeptidases externas, gerando resíduos de cisteína e glicina, que podem ser utilizados pelas células. Os resíduos  $\gamma$ -glutamilo são substratos da  $\gamma$ -glutamil ciclotransferase, que vai convertê-los em 5-oxoprolina e respectivos aminoácidos. A conversão da 5-oxoprolina em glutamato é catalisada pela 5-oxoprolinase (Meister, 1988; Dalton, 2004; Lu, 2009).

A principal função do GSH é a desintoxicação de xenobióticos e/ou seus metabolitos. Esses compostos são electrófilos que formam conjugados com GSH, *in vivo* durante o *stress* oxidativo, por equilíbrio químico ou por via enzimática numa reacção catalisada pelo enzima glutathione-S-transferase (GST). A sua expressão é regulada pelo estado redutor celular e representa um sensor capaz de transmitir a variação do ambiente redutor para a cascata apoptótica, modulando a via de *stress* por cinases (Pastore, 2003; Lu, 2009).

Em leveduras os conjugados formados são usualmente excretados para o vacúolo. Embora a maior parte das reacções de conjugação com o GSH levem à desintoxicação de compostos, ocasionalmente o próprio produto torna-se altamente reactivo (Penninckx, 2000; Lu, 2009).

O GSH é reciclado pelo ciclo do glutationo, catalisado pela GPx e GR, enquanto que é consumido na produção de conjugados de GSH pela GST ou pela sua excreção da célula. Ambos os processos diminuem o nível de GSH total intracelular. Portanto, a fim de manter a concentração de GSH intracelular constante, o consumo de GSH tem que ser repostado pela “ressíntese” a partir dos seus aminoácidos constituintes (Pastore, 2003).

O enzima glutationo redutase (GR) contém um grupo FAD e catalisa a seguinte reacção:  $(\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+)$  onde utiliza os equivalentes redutores do NADPH, proveniente, em parte, da via das pentoses-fosfato. É o principal responsável pela redução do glutationo (GSH) e manutenção da razão GSH/GSSG nas células. O gene codificante deste enzima foi identificado em *S. cerevisiae*. As células mutantes que não expressam este gene, são viáveis, mas ocorre acumulação de GSSG e são sensíveis aos pró-oxidantes (Jamieson, 1998; Penninckx, 2000; Pastore, 2003; França, 2007).

Além de reagir directamente com espécies radicalares, o GSH também pode doar electrões ao glutationo peroxidase. O enzima glutationo peroxidase (GPx) é uma selenoproteína, pertencente a uma família de isoenzimas envolvidas na remoção de ROS, reduzindo-as, como acontece com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  que é produzido pela SOD e outros lipoperóxidos, convertendo-os num derivado menos tóxico e utilizando o GSH como agente redutor, a qual catalisa a seguinte reacção:  $2 \text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$  (Jamieson, 1998; Penninckx, 2000; Pastore, 2003; Kho, 2004; França, 2007; Toppo, 2009).

Existem cinco tipos distintos de Gpx: Gpx clássica (ou citoplasmática) (Gpx-1), Gpx gastrointestinal (Gpx-2), Gpx plasmática (Gpx-3), Gpx de lipofosfoperóxidos (Gpx-4) e Gpx epidímio-específica (Gpx-5). A Gpx-1 é induzida pela escassez de glucose e a Gpx-2 através pelo *stress* oxidativo numa forma dependente de Yap1p. Todos os tipos de Gpxs têm capacidade para reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , alquilperóxidos e lipoperóxidos (Kho, 2004). A *S. cerevisiae* possui três formas homólogas da Gpx (codificados pelos genes GPX1, GPX2 e GPX3) (Inoue, 1999; Tsuzi, 2004).

Embora a Gpx-1 possa proteger as biomembranas contra a peroxidação lipídica, provavelmente mediada por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , não reduz lipoperóxidos de complexos lipídicos, pelo que a peroxidação lipídica, necessita da acção conjugada da fosfolipase  $\text{A}_2$  (Toppo, 2009; Avery, 2001).

A Gpx-4 é monomérica e parcialmente associada à membrana, enquanto que a Gpx clássica é tetramérica. Além disso, a Gpx-4 é funcionalmente diferente das outras Gpx, pois também reduz lipoperóxidos de lípidos esterificados das biomembranas. Os lipoperóxidos

são os intermediários centrais da peroxidação lipídica, que é um dos principais agentes de danos oxidativos nas células, associado à perturbação da membrana, inactivação de proteínas de membrana e lise celular. A peroxidação lipídica está também associada a condições patológicas como a isquémia, aterosclerose e cancerigénese. Deste modo, a Gpx-4 é o enzima reparador da peroxidação lipídica membranar, sendo por esse motivo considerada como a principal linha de defesa contra os danos oxidativos nas membranas. Apesar disso, as restantes Gpx são mais comuns que a Gpx-4 (Avery, 2001). Em leveduras a actividade glutatióno peroxidase pode ser induzida por alterações das condições de crescimento anaeróbia - aeróbias (Jamieson, 1998).

O enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) regulador da via das pentoses-fosfato é crucial para a produção de equivalentes redutores na forma de NADPH, que é requerido para que o enzima GR exerça a sua acção, reduzindo o dissulfureto de glutatióno (GSSG) a GSH, que é gerado quando o GSH protege as células dos radicais livres gerados pelo  $H_2O_2$ . Portanto, uma vez que o GSH é um antioxidante importante, não é de surpreender que mutações nos genes que codificam a G6PD afecte negativamente a via das pentoses-fosfato, e tornando as células hipersensíveis a oxidantes como o  $H_2O_2$  (Jamieson, 1998; Porter, 2000; Berg, 2002; Ramnanan, 2006).

Estudos de Ramnanan (2006) e Shin (2008) revelaram que o enzima G6PD desempenha um papel importante no crescimento celular, na sobrevivência e particularmente na geração de NADPH necessária para a manutenção do ambiente redutor.

A catalase é uma hemoproteína com estrutura homotetramérica, possui quatro grupos hemo prostéticos (Monti, 2003), que catalisam a conversão de peróxido de hidrogénio em água e dioxigénio. A sua actividade catalítica está presente em quase todas as células, órgãos e microrganismos aeróbios. A catalase em leveduras foi caracterizada pela primeira vez por Seah and Kaplan (1973).

Células de *S. cerevisiae* possuem duas catalases, Catalase A (CAT A) peroxissomal, e Catalase T (CAT T) citoplasmática. O papel da CAT A parece estar envolvido na desintoxicação de  $H_2O_2$  gerado a partir da acil-CoA oxidase durante a  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos dos peroxissomas. Embora a expressão da CAT A seja induzida pelo crescimento de leveduras, utilização de ácidos gordos como fonte exclusiva de carbono, células com mutação na expressão da CAT A continuam a conseguir crescer nessas condições, o que sugere que a actividade CAT peroxissomal é dispensável (Herrero, 2008; Zandycke, 2002; Jamieson, 1998).

No entanto, a expressão da CAT T é induzida sob *stress* oxidativo, *stress* osmótico, escassez da fonte de carbono ou por processos de congelamento-descongelamento. O papel da CAT T no citoplasma é pouco claro. Células com mutação na expressão da CAT T apresentam um crescimento exponencial semelhante ao das células nativas em condições

aeróbias, sem alterar a sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Embora a expressão da catalase T apenas seja moderadamente induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alguns autores consideram-na importante para a resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Herrero, 2008; Zandycke, 2002; Jamieson, 1998).

## 1.6. Composição lipídica das membranas

Os lipídios são moléculas de armazenamento de energia e importantes componentes estruturais das membranas celulares. Os principais componentes lipídicos das membranas eucariotas são os fosfolípidos, esteróis, esfingolípidos e glicoglicerolípidos. Alguns lípidos são designados como essenciais, contudo ainda não são conhecidas as suas funções específicas. No entanto, outros estudos indicaram que lípidos específicos de membrana e seus intermediários encontram-se envolvidos em vias de sinalização, desempenhando papel importante na regulação de processos celulares vitais (Daum, 1998; Rajakumari, 2008).

As membranas das células eucariotas desempenham uma série de funções importantes; servem como barreira de difusão entre o interior da célula e o exterior, e entre o lúmen de organelos e o citoplasma, possuem proteínas de membrana que realizam o transporte selectivo de moléculas e/ou actuam como enzimas que participam na regulação de vias de metabólicas (Daum, 1998).

A membrana plasmática de *S. cerevisiae* assemelha-se à dos eucariotas superiores no que diz respeito à sua composição lipídica. O ergosterol, o principal esteroide das leveduras, e os esfingolípidos encontram-se altamente concentrados na membrana plasmática, e a composição em glicerofosfolípidos é diferente das membranas internas. Nenhum desses lípidos é sintetizado na membrana plasmática, por conseguinte, os lípidos sintetizados no retículo endoplasmático, mitocondrio e complexo de Golgi devem ser transportados até à periferia celular. Os mecanismos de transporte dos lípidos nas leveduras é o mesmo que nas células eucariotas superiores, como o transporte de monómeros com ou sem catálise das proteínas, transporte vesicular e transferência através do contacto entre doador e receptor de membrana (Schnabl, 2005).

As leveduras, assim como outros microrganismos, possuem uma variedade de lípidos, cujo conteúdo e composição podem ser geneticamente afectados e/ou condicionados pelas condições de crescimento, o que os torna adaptados a uma elevada produção de lípidos específicos. Além disso, possuem algumas vantagens em relação a outros microrganismos: são eucariotas, geralmente não tóxicos e têm sido utilizados na indústria alimentar (Rajakumari, 2008).

Os esteróis são constituintes maioritários das membranas biológicas das leveduras, onde regulam a sua fluidez e permeabilidade. Tanto os esteróis como os ácidos gordos

podem participar em vias de sinalização regulando a expressão genética via elementos promotores. Grande quantidade desses lípidos é segregada dentro da célula de forma a conservar a sua energia química e evitar uma possível intoxicação e consequente perturbação da membrana, por acumulação de ácidos gordos, esteróis, e ésteres de esteróis (Czabany, 2007; Rajakumari, 2008).

Os TAG e os ésteres de esterol armazenados em vesículas citoplasmáticas sofrem hidrólise, com libertação de esteróis, diacilgliceróis (DAG) e ácidos gordos. Em *S. cerevisiae*, esses produtos de degradação servem como blocos para a síntese de membranas lipídicas também utilizadas como reserva de energia (Czabany, 2007; Rajakumari, 2008).

Os DAG são precursores da síntese da fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina através da via de Kennedy, além disso, também funcionam como moléculas de sinalização celular. Os ácidos gordos provenientes da degradação dos TAG e ésteres de esterol podem ser reincorporados em complexos lipídicos após a sua activação pelo CoA (Czabany, 2007).

Apesar de, a maioria das etapas de biossíntese de lípidos em leveduras serem semelhantes à dos eucariotas superiores, algumas são exclusivas das leveduras, como por exemplo, a síntese de fosfatidilserina que requer a presença de CDP-diacilglicerol. Outro exemplo, ocorre na biossíntese do esterol específico das leveduras, ergosterol, onde é requerida a presença de vários enzimas que não são encontrados na biossíntese do colesterol em mamíferos ou na biossíntese de sitoesterol nas plantas (Daum, 1998).

Os esteróis são componentes maioritários das membranas eucariotas e onde também podem encontrar-se esterificados com resíduos acilo. Enquanto os esteróis são moléculas anfipáticas que se encontram incorporadas nas membranas, os ésteres de esteróis são fortemente hidrofóbos e formam agregados lipídicos. O ergosterol, o esterol maioritário dos fungos, difere do colesterol, o esterol dos animais, devido à presença de duplas ligações no C-7,8 do anel e no C-22 da cadeia lateral, assim como, pela presença de um grupo metilo no C-24 da cadeia lateral. No entanto, é comum a todos os esteróis a saturação no C-5,6 e a presença de um grupo hidroxilo no C-3, que confere a componente hidrófila à molécula e permite uma orientação correcta da molécula na membrana (Daum, 1998; Czabany, 2007).

O ergosterol não se encontra presente em quantidade igual em todas as membranas sendo encontrado em grande quantidade na membrana plasmática e em vesículas de secreção. Em contrapartida, as membranas retículo endoplasmático, do mitocondrio e de outros compartimentos possuem quantidade significativamente baixa de ergosterol mas uma concentração relativa de intermediários de esterol elevada. Nas leveduras o ergosterol está mais concentrado na membrana interna do que na externa, ao contrário do que acontece nos eucariotas superiores (Daum, 1998).



Os principais fosfolípidos encontrados nas membranas de *S. cerevisiae* são a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina. As membranas mitocondriais contêm também fosfatidilglicerol e cardiolipina. A fosfatidilcolina é o produto final da síntese de fosfolípidos e é um dos componentes estruturais que se encontra nas membranas de *S. cerevisiae*, além disso, serve também como um depósito de precursores de vários segundos mensageiros. Pode ser sintetizada a partir de dois percursos alternativos, a via de CDP-diacilglicerol e a via de CDP-colina, via de Kennedy. As vias de síntese da fosfatidilcolina em *S. cerevisiae* são realizadas por enzimas comuns às células dos mamíferos, com excepção da síntese de fosfatidilserina. Em leveduras, a fosfatidilserina é sintetizada a partir do CDP-diacilglicerol e serina, enquanto nas células de mamíferos, é sintetizado por uma reacção onde ocorre a troca da serina pela etanolamina e/ou colina da fosfatidiletanolamina e/ou fosfatidilcolina (Carman, 1999).

Os eucariótas utilizam os triacilgliceróis (TAG), derivados de glicerol no armazenamento de energia devido às suas propriedades hidrófobas que permitem uma disposição intracelular das partículas lipídicas sem afectar o ambiente polar hidrófilo. Outro precursor importante da biossíntese dos TAG é o ácido fosfatídico (Rajakumari, 2008).

Nas leveduras foram identificadas duas vias biossintéticas de ácido fosfatídico, nomeadamente a via do glicerol-3-fosfato e a via da di-hidroxicetona fosfato, que envolvem reacções de acilação do glicerol-3-fosfato ou da di-hidroxicetona fosfato, respectivamente. O ácido fosfatídico não actua apenas como precursor da formação de TAG, mas constitui um intermediário central do metabolismo de glicerofosfolípidos. Além disso, o ácido fosfatídico actua como regulador da biossíntese de lípidos em leveduras, devido à sua capacidade para ligar-se e inactivar o repressor da transcrição Opi1p, permitindo assim a expressão de vários enzimas implicados na biossíntese de lípidos (Rajakumari, 2008).

A formação de triacilgliceróis através da via dependente de acil-CoA requer um glicerofosfolípido como doador de grupos acilo para a esterificação do diacilglicerol. O enzima que catalisa a transferência do grupo acilo da molécula doadora para o diacilglicerol, combina funções de uma fosfolipase A<sub>2</sub> (ou B) com a de uma aciltransferase. Nas leveduras, outra reacção leva à formação de triacilgliceróis catalisada por um enzima homólogo ao dos humanos, a lecitina:colesterol aciltransferase, convertendo o diacilglicerol em triacilglicerol numa reacção de esterificação independente de acil-CoA que utiliza glicerofosfolípidos, preferencialmente a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, como doadores de resíduo acilo (Czabany, 2007; Daum, 2007).



## **2. Problema e Objectivos**



## 2.1. Problema

O vanádio é um metal de transição com distribuição ubíqua pela crosta terrestre que pode assumir vários estados de oxidação que variam desde (+2) a (+5). É utilizado no endurecimento de ligas metálicas, como constituinte de produtos cerâmicos, corantes e fitofármacos, podendo também ser encontrado em níveis elevados nos combustíveis fósseis. Processos industriais como endurecimento de ligas metálicas têm contribuído para o aumento da concentração de vanádio no meio ambiente, o que o torna um poluente. Os compostos de óxido de vanádio, como o pentóxido de vanádio, assumem elevada importância em fisiologia celular pois têm sido testados como inibidores de processos celulares *in vitro* comportando-se o  $V_2O_5$  como um poderoso agente oxidante gerador de radicais livres. Apesar de se encontrar descrito como mutagénico e genotóxico, capaz de afectar a  $H^+$ ATPase mitocondrial e sub-mitocondrial de *S. cerevisiae*, tem sido também demonstrado que exerce efeitos antitumorais activando vias de sinalização que despoletam a apoptose ou induzem enzimas que metabolizam os xenobióticos que degradam cancerígenos activos. Estes factos contribuíram para a selecção do pentóxido de vanádio como agente de *stress* a ser testado em *S. cerevisiae*, um eucariota, unicelular, GRAS.

Como em condições fisiológicas, o fluxo de electrões ao longo da cadeia respiratória constitui a principal fonte intracelular de ROS e as três NADH desidrogenases insensíveis à rotenona, NDI I, NDE I e NDE II, da membrana mitocondrial podem ser locais preferenciais de formação de radicais superóxido no mitocondrio e, por outro lado, a NADPH (P450) desidrogenase, do sistema de transporte de electrões do retículo endoplasmático ao transferir equivalentes redutores do NADPH para os citocromos P450, também leva à formação ROS, foram eleitos por serem locais geradores de ROS na levedura.

Considerando que como resposta às ROS a célula eucariota desenvolveu mecanismos de defesa não-enzimáticos e enzimáticos, como o glutationo, e as actividades enzimáticas CAT T, G6PD, GR e GPx, seleccionou-se estes parâmetros como marcadores de *stress* oxidativo e da resposta antioxidativa ao pentóxido de vanádio.

Tendo em conta que os sistemas membranares definem a compartimentação celular e como tal são alvos potenciais da peroxidação lipídica, e por outro lado, disponibilizam o ambiente adequado ao funcionamento das desidrogenases do mitocondrio e retículo endoplasmático, elegeu-se também como alvos deste estudo a quantificação do MDA como marcador de danos celulares, bem como, a quantificação de fosfolípidos, ergosterol e triacilgliceróis que desempenham papéis importantes na manutenção da hidrofobicidade, permeabilidade e rigidez membranar, e de reserva energética intracelular.

Na sequência do que foi exposto, o objectivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência celular ao pentóxido de vanádio, bem como, a resposta de sistemas de

transporte de electrões mitocondrial e do reticulo endoplasmático, ambiente redox mitocondrial, resposta antioxidativa citoplasmática, e do ambiente lipídico de diferentes compartimentos celulares das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, nativa vínica; Red fruit, comercial vínica; BY4741, estirpe de utilização comum em investigação, ao referido composto metálico.

## 2.2. Objectivo geral

Este estudo procurou avaliar a resposta ao pentóxido de vanádio por *Saccharomyces cerevisiae*, em termos de sobrevivência celular, sistemas de transporte de electrões e ambiente lipídico do retículo endoplasmático e do mitocondrio, bem como, defesas enzimáticas e não-enzimáticas antioxidantes

## 2.3. Objectivos específicos

### Conhecer:

- Efeitos em *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 pelo V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sobre:
  - Crescimento celular,
  - Ambiente lipídico do mitocondrio e retículo endoplasmático,
  - Desidrogenases do mitocondrio e retículo endoplasmático,
  - Capacidade antioxidante do glutationo no mitocondrio,
  - Enzimas antioxidantes citoplasmáticos GR, GPx, G6PD e CAT T,
  - Extensão de danos celulares, expressos pelo MDA,

### Compreender:

- Alterações em *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 exercidas pelo V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sobre:
  - Crescimento celular;
  - Conteúdo em TAG, ERG e PL do mitocondrio e retículo endoplasmático;
  - Actividades enzimáticas desidrogenases do mitocondrio e retículo endoplasmático,
  - Conteúdo em GSH e GSSG do mitocondrio,
  - Actividades GR, GPx, G6PD e CAT T citoplasmáticas;
  - Conteúdo em MDA citoplasmático,

### Dar valor:

- Às alterações em *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 expostas V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> em termos:
  - Curva de crescimento,
  - Viabilidade celular,
  - Actividades enzimáticas ND e CPR, mitocondrio e retículo endoplasmático,
  - Actividades enzimáticas GR, GPx, G6PD e CAT T, antioxidantes
  - Conteúdo em TAG, ERG e PL do mitocondrio e retículo endoplasmático

- Razão GSH/GSSG mitocondrial como marcador de *stress* oxidativo
- Conteúdo intracelular de MDA como marcador de danos celulares

**Aplicar:**

- Curvas de crescimento para avaliar a resposta fisiológica a outros metais;
- Viabilidade celular de *S. cerevisiae* como marcador da sobrevivência a outros metais;
- Actividades enzimáticas GR, GPx, G6PD e CAT T na detecção de alterações da resposta antioxidante a outros metais;
- Variações nas actividades enzimáticas ND e CPR, como marcadores de alterações do funcionamento mitocondrial e do retículo endoplasmático por acção de outros metais.
- À razão GSH/GSSG na detecção de *stress* oxidativo e morte celular;
- A concentração intracelular de MDA como marcador de danos celulares, na estimativa de risco à exposição a metais



### 3. Metodologia

#### 3.1. Estratégia

**Local:** Laboratórios de Bioquímica Analítica, Fase III, Colégio Luis António Verney, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora

**Apoios:**

Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) e Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora

**Duração:** 1 ano

**Modelos biológicos:**

Levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, estirpe isolada em vinhos regionais do Alentejo depositada na colecção do laboratório de enologia da Universidade de Évora, gentilmente cedida pelo Eng. Paulo Laureano.

Levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* Red fruit, estirpe comercial para vinificação, gentilmente cedida pelo Eng. Óscar Gato da Adega Cooperativa de Borba

Levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, modelo de utilização comum em investigação, comercializada pela Invitrogen

**Agente stress:** Pentóxido de vanádio (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)

**Ensaios:**

Controlo, 72h crescimento sem exposição ao indutor de *stress*

Teste, 72h crescimento em presença de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (2,0 mM) no meio de cultura

**Parâmetros a analisar:**

Curva de crescimento das três estirpes *S. cerevisiae*, pela turbidez e cfu

Determinação da biomassa no final do ensaio

Doseamento de proteínas totais nas fracções mitocondrial, microssomal e citosólica

Determinação de lípidos totais, ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos nas fracções mitocondrial, microssomal

Determinação da actividade enzimática da NADH redutase na fracção mitocondrial

Determinação da actividade enzimática da NADPH P450 redutase na fracção microssomal

## Determinação de conteúdos e marcadores enzimáticos antioxidantes citoplasmáticos

Catalase T

Glucose-6-fosfato desidrogenase

Glutationo peroxidase

Glutationo redutase

Glutationo e dissulfureto de glutationo

Malonodialdeído

### **Técnicas utilizadas:**

Cultura de microrganismos

Análise e processamento de imagens de cfu

Obtenção de lisados celulares através de ultra-sons

Centrifugação e ultra-centrifugação para obtenção de fracções celulares

Extracção por solventes

Determinação de actividades enzimáticas e conteúdos por espectrometria de absorção molecular

Determinação de conteúdos por espectrometria de fluorescência

Ferramentas informáticas como folha de cálculo e software para análise estatística

## 3.2. Procedimento Experimental

### 3.2.1. Material biológico

Neste trabalho utilizaram-se três estirpes de *S. cerevisiae*:

- A levedura vínica UE-ME<sub>3</sub> isolada de mostos de vinhos do Alentejo depositada na colecção do laboratório de enologia – Universidade de Évora. Esta estirpe é desde há algum tempo utilizada no nosso laboratório em estudos Bioquímicos de sobrevivência a fenilureias e metais de transição (Ferreira, 2006; Rosado, 2009).

- A levedura vínica Red fruit utilizada em processos de vinificação para obtenção de vinho tinto, a qual é comercialmente apresentada como exibindo as seguintes características: temperatura de fermentação 14-34 °C; fase de latência curta; velocidade de fermentação elevada; tolerância ao álcool 16 %; necessidade em oxigénio elevada; necessidade em azoto elevada; intensa produção de aromas de fruta e violeta; elevada produção de glicerol. Fornecida pela Adega Cooperativa de Borba.

- A levedura comercial de utilização comum em investigação *BY4741* (MATa his3Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ; EUROSCARF, Alemanha), comercializada pela Invitrogen. A estirpe *BY4741* pertence à família BY de leveduras que constitui uma subfamília isogénica da estirpe *S288c*. Esta estirpe é recorrentemente utilizada como referência em estudos metabólicos em leveduras, como por exemplo, em estudos de toxicidade de metais pesados e de stress oxidativo (Herdeiro, 2006).

As leveduras encontravam-se armazenadas no nosso laboratório a -80 °C numa suspensão de meio de cultura e glicerol.

### 3.2.2. Meios de cultura

Preparou-se meio líquido YEPD (1/3 de líquido para 2/3 de ar) para inocular os microrganismos em estudo, constituído por peptona 20 g/L, extracto de levedura 10 g/L e glucose 20 g/L (Atlas, 2006).

Esterilizou-se pelo calor húmido o meio de cultura sem glucose, a qual foi esterilizada por filtração (filtro 0,2 μ) e adicionada posteriormente.

Preparou-se também meio sólido YEPD, por adição de agar 1,5 %, antes da esterilização pelo calor húmido, para aplicação em placa e contagem de cfu.

Para o estudo de exposição de *S. cerevisiae* utilizou-se meio YEPD-V (1/3 de líquido para 2/3 de ar) preparado por adição ao meio líquido YEPD esterilizado, solução de óxido de vanádio (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) esterilizada por filtração (filtro 0,2 µ) de forma a obter a concentração de 2,0 mM. No delineamento deste estudo a concentração do agente de *stress* foi eleita com base em resultados prévios, obtidos no mesmo laboratório, que demonstraram a sobrevivência da estirpe UE-ME<sub>3</sub> à presença de vanádio nesta concentração (Conim, 2008; Rosado, 2008; Rosado, 2009).

### 3.2.3. Cultura de microrganismos

As leveduras conservadas a -80 °C em meio de cultura contendo glicerol foram inoculadas em meio líquido YEPD e incubadas *over night* num banho termoestabilizado a 28 °C com agitação orbital 150 rpm. Com esta cultura fresca inoculou-se o meio YEPD líquido e acompanhou-se o crescimento por leitura da turbidez a 640 nm até 0,8. O ensaio foi iniciado inoculando meio YEPD ou YEPD-V com a cultura anterior, em fase exponencial média, de forma a iniciar a cultura ensaio com turbidez de 0,15. As células incubaram nas condições anteriores durante 72 h, período de exposição das leveduras ao agente de *stress*. O crescimento da cultura foi acompanhado por leitura da turbidez a 640 nm e contagem de cfu em placa com YEPD sólido.

### 3.2.4. Obtenção das fracções mitocondrial, microssomal e citosólica

No final do tempo de exposição, as células foram recolhidas por centrifugação a 3000 g, durante 20 min a 4 °C, de seguida as células recolhidas foram lavadas três vezes com água ultra-pura estéril e foram novamente centrifugadas a 3000 g durante 20 min.

O sedimento resultante, células sedimentadas, foi ressuscitado numa solução tampão Tris-acetato (0,05 M) pH 7.5, manitol (0,25 M), e EDTA (1 mM) numa proporção de 1 a 5 g, peso húmido de células, por 30 mL de meio.

A suspensão celular foi lisada através de um homogeneizador celular de ultra-sons durante 15 min, a 4 °C e com uma frequência de 10 Hz. De seguida a suspensão foi a centrifugar a 800 g durante 20 min.

O sedimento obtido foi desprezado e decantou-se o sobrenadante para submeter a nova centrifugação a 12000 g durante 30 min a 4 °C, a qual permitiu obter a sedimentação

da fracção mitocondrial, de acordo com Tzagaloff (1971), que foi ressuspendida em tampão Tris-acetato (0,01 M) pH 7.5 contendo sacarose (0,25 M) e de imediato guardado em alíquotas a -20 °C.

O sobrenadante resultante da sedimentação da fracção mitocondrial foi utilizado para obtenção da fracção microssomal por ultra-centrifugação a 105000 g durante 1h a 4 °C que permitiu obter a sua sedimentação. A fracção microssomal obtida foi ressuspendida em tampão fosfato (0,1 M) pH 6,5 e guardada em alíquotas a -20 °C, o sobrenadante resultante, a fracção citosólica, foi também armazenado em alíquotas a -20 °C.

### **3.2.5. Obtenção do extracto enriquecido em lípidos, ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos**

Após a obtenção das fracções mitocondrial e microssomal, como descrito no capítulo 3.2.4, procedeu-se à obtenção de um extracto enriquecido em lípidos, ergosterol e fosfolípidos recorrendo ao método de Folch (1957), as fracções foram separadamente ressuspendidas em 2 mL de TCA 5 % e 2 mL de água. De seguida, procedeu-se à centrifugação a 1600 g durante 10 min.

O sedimento obtido foi ressuspendido em 5 mL da mistura de clorofórmio-metanol (2:1), com o auxílio de uma vareta de vidro agitou-se a mistura ficando em repouso *overnight*.

Posteriormente adicionou-se 1 mL de cloreto de sódio 0,73 % a 4 °C, deixando separar as fases. A fase aquosa é desprezada e a fase orgânica filtrada através de filtro Whatman 1PS para frascos devidamente tarados.

Os extractos foram a secar em corrente de azoto a 37 °C, sendo de seguida guardados a 4 °C. Na determinação do conteúdo em ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos o extracto, em frio, foi ressuspendido em 1 mL de clorofórmio.

### **3.2.6. Quantificação do conteúdo em ergosterol**

Para a quantificação de ergosterol, o método fundamenta-se no protocolo descrito por Abe (2009) que detecta enzimaticamente o peróxido de hidrogénio gerado pela oxidação de esteróis livres pela colesterol oxidase. A eficácia do reconhecimento do ergosterol pelo enzima colesterol oxidase, por esta aproximação experimental, é de aproximadamente 90

%, expressa em colesterol, o substrato-padrão utilizado na construção da curva de calibração.

Procedeu-se à quantificação retirando 0,150 mL do extracto lipídico para tubos de ensaio que foram levados à secura em corrente de azoto a 37 °C. De seguida, o extracto obtido foi ressuscitado em 0,020 mL de etanol absoluto a 4 °C juntamente com 0,980 mL de tampão de reacção: tampão Good (50 mM) pH 6.7, colesterol oxidase ( $\geq 300$  U/L), colesterol esterase ( $\geq 300$  U/L), ácido hidroxibenzóico (12 mM), 4-aminoantipirina (0,3 mM), peroxidase ( $\geq 10$  kU/L), azida de sódio (< 0,1 %) (Allain, 1974; Abe, 2009).

Agitou-se a mistura no vórtex e deixou-se repousar durante 10 min a 37 °C. Leu-se a absorvência das amostras e dos padrões a 510 nm a 37 °C. A concentração de ergosterol presente no extracto foi determinada por interpolação da curva de calibração construída para o intervalo de concentração entre 6 a 100  $\mu$ M (Figura A.1).

### **3.2.7. Quantificação do conteúdo em triacilgliceróis**

Para a quantificação em triacilgliceróis foi retirado 0,100 mL do extracto lipídico para tubos de ensaio que foram levados à secura em corrente de azoto a 37 °C. De seguida, o extracto obtido foi ressuscitado em 0,020 mL de etanol absoluto a 4 °C juntamente com 0,980 mL de tampão de reacção: tampão Good (50 mM) pH 6,7, ATP (1,1 mmol/L), glicerolquinase ( $\geq 1000$  U/L), glicerol-3-fosfato oxidase ( $\geq 2000$  U/L), peroxidase ( $\geq 2500$  U/L), lipoproteinlipase ( $\geq 1500$  U/L), 4-aminoantipirina (0,2 mmol/L), TOOS (N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina) (0,6 mmol/L), azida de sódio (< 0,1 %) (Allain, 1974; Fossati, 1982).

Agitou-se a mistura no vórtex e deixou-se repousar durante 10 min a 37 °C. Leu-se a absorvência das amostras e dos padrões a 546 nm a 37 °C. A concentração de triacilgliceróis presente no extracto foi determinada por interpolação da curva de calibração construída para o intervalo de concentração entre 2 a 40  $\mu$ M (Figura A.2).

### **3.2.8. Quantificação do conteúdo em fosfolípidos**

Para a quantificação em fosfolípidos foi retirado 0,100 mL do extracto lipídico para tubos de ensaio que foram levados à secura em corrente de azoto a 37 °C. De seguida, o extracto obtido foi ressuscitado em 0,020 mL de etanol absoluto a 4 °C juntamente com 0,980 mL de tampão de reacção: TES (50 mM) pH 7, ácido 4-hidroxibenzóico (12 mM), EDTA (1,3 mM), fosfolipase D (> 1500 U/L), colina oxidasa (> 7500 U/L), 4-aminoantipirina

(1,2 mM), peroxidase (> 7000 U/L), azida de sódio (< 0,1 %), detergentes (Takayama, 1977; Nie, 1993).

Agitou-se a mistura no vórtex e deixou-se repousar durante 10 min a 37 °C. Leu-se a absorvência das amostras e dos padrões a 520 nm a 37 °C. A concentração de fosfolípidos presente no extracto foi determinada por interpolação da curva de calibração construída para o intervalo de concentração entre 4 a 80 µM (Figura A.3).

### 3.2.9. Quantificação de proteínas totais

Foram quantificadas as proteínas existentes nas fracções em estudo através do método de Lowry (1951). Uma mistura reaccional foi preparada em tubos de ensaio, pela adição de 0,2 mL de amostra ou solução padrão diluída em NaOH (0,5 M), para um volume final de 1mL, com 5,0 mL de Reagente de Lowry. Agitou-se a mistura no vórtex e após repousar 10 min, adicionou-se 0,5 mL de Reagente de Folin-Ciocalteu diluído, seguido de agitação no vórtex. Aguardou-se 30 min para desenvolvimento do cromóforo e leu-se a absorvência a 720 nm.

Construímos a curva de calibração para o intervalo de concentração de 50 a 200 µg/mL, utilizando uma solução de soro de bovino (BSA) como padrão (Figura A.4) e calculámos, por interpolação gráfica a concentração de proteínas na amostra.

### 3.2.10. Determinação de GSH e GSSG

Procedeu-se à determinação de GSH e GSSG na fracção mitocondrial de acordo com o método fluorimétrico descrito por Hissin (1976).

Inicialmente procede-se à incubação de uma alíquota da fracção mitocondrial com ácido metafosfórico 25 % em tampão fosfato de sódio (0,1 M) pH 8, EDTA (5 mM), durante 10 min a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 13000 g, durante 10 min a 4 °C, o sobrenadante resultante foi utilizado na determinação de GSH e GSSG (Jia, 2008).

Na determinação do GSH uma alíquota de sobrenadante foi incubada com OPT em tampão fosfato (0,1 M) pH 8, EDTA (5 mM), na proporção de 1:30:2, durante 15 min, à temperatura ambiente com agitação. A intensidade da fluorescência foi medida a  $\lambda_{exc}$  350 nm e  $\lambda_{em}$  420 nm (Jia, 2008; Hissin, 1976). A concentração de GSH na amostra foi determinada por interpolação na curva de calibração construída no intervalo de concentração ente 0,25 e 5 µM (Figura A.5).

A determinação do GSSG foi realizada utilizando uma alíquota do sobrenadante com NEM (*N*-metilmaleimida), o qual vai sequestrar o GSH presente na amostra, a qual incubou

30 min à temperatura ambiente, com agitação. De seguida, incubou-se essa mistura reaccional com OPT e NaOH (0,1 M), na proporção de 1:1:1:18, durante 15 min à temperatura ambiente com agitação. A potência de fluorescência foi medida a  $\lambda_{exc}$  350 nm e  $\lambda_{em}$  420 nm (Hissin, 1976; Jia, 2008). A concentração de GSSG na amostra foi determinada por interpolação na curva de calibração construída no intervalo de concentração ente 0,4 e 12  $\mu$ M (Figura A.6).

### 3.2.11. Determinação do MDA

O MDA é um composto reactivo que pode atacar grupos amina de proteínas e fosfolipídios, modificando estas moléculas biológicas e activando uma resposta auto-imunitária. Neste método seguiu-se o protocolo descrito por Ohkawa (1979) e Durfinova (2007) tendo-se construído uma curva de calibração para o malonodialdeído no intervalo entre 2,5 e 100  $\mu$ M (Figura A.7). O padrão de malonodialdeído foi preparado a partir do 1,1,3,3-tetrametoxipropano que o liberta por hidrólise em meio ácido (Turton, 1997).

Procedeu-se à determinação do malonodialdeído nas fracções citosólica, através de uma mistura de reacção composta por SDS 8,1%, TBA 0,4 % em ácido acético 10 %, pH 3,5 e amostra da fracção citosólica, foi preparado um branco com mesma composição com excepção da amostra que foi substituída por H<sub>2</sub>O. Agitou-se no vortéx e incubou-se num banho com agitação a 95 °C, durante 60 min. Após o tempo de incubação, colocaram-se os tubos com a mistura reaccional a 4 °C durante 15 min. De seguida, adicionou-se *n*-butanol à mistura, levou-se ao vortéx e deixou-se repousar à temperatura ambiente, durante 60 min. Centrifugou-se a 1250 *g* durante 20 min, para acentuar mais a diferença de fases. Retirou-se uma alíquota da fase superior e leu-se a potência de fluorescência a  $\lambda_{exc}$  515 nm e  $\lambda_{em}$  553 nm.

### 3.2.12. Determinação de Actividades Enzimáticas

#### 3.2.12.1. NADH (ubiquinona) desidrogenase

Foi determinada a actividade enzimática NADH (ubiquinona) desidrogenase da fracção mitocondrial de acordo com o procedimento proposto por Ludovico (2002).





Preparou-se, para cada situação, uma mistura reaccional, em células de absorção molecular, composta por tampão fosfato (10 mM) pH 7,5, KCN (100 µM), citocromo c (22,5 µM) e amostra da fracção mitocondrial com a concentração adequada de proteína (entre 0,01 e 0,025 mg/mL), incubou-se durante 2 min a 30 °C. A reacção foi iniciada pela adição de NADH 0,5 mM.

Leu-se a absorvência a 550 nm durante 180 s a 30 °C, contra um branco com a mesma composição que a célula de reacção, com excepção da amostra, por espectrometria de absorção molecular com temperatura controlada e banho com circulação de água.

Determinámos o valor dos coeficientes angulares das rectas de reacção obtidas (r entre 0,99436 e 0,99945; Figura A.8–A.9) e a partir deles calculámos a actividade enzimática utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para a forma ferrosa do citocromo c.

### 3.2.12.2. NADPH (P450) desidrogenase

Foi determinada a actividade enzimática NADPH (P450) desidrogenase na fracção microsomal de acordo com procedimento proposto por Lake (1987).



Preparou-se, para cada situação, uma mistura reaccional, em células de absorção molecular, composta por tampão fosfato (0,1 M) pH 7,6, KCN (15 mM), citocromo c (0,5 mM) e amostra da fracção microsomal com a concentração adequada de proteína (entre 0,01 e 0,025 mg/mL). Incubou-se durante 3 min a 37 °C. Iniciando-se a reacção com adição de NADPH (0,4 mM).

Leu-se a absorvência a 550 nm durante 180 s a 37 °C, contra um branco com a mesma composição que a célula de absorção de reacção com excepção do NADPH, em espectrómetro de absorção molecular com temperatura controlada e banho com circulação de água.

Determinámos o valor dos coeficientes angulares das rectas obtidas (r entre 0,98738 e 0,99603; Figura A.10– A.11) e a partir deles calculámos a actividade enzimática utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para a forma ferrosa do citocromo c.

### 3.2.12.3. Catalase T

Foi determinada a actividade da catalase T na fracção citosólica, de acordo com o método proposto por Beers (1952).

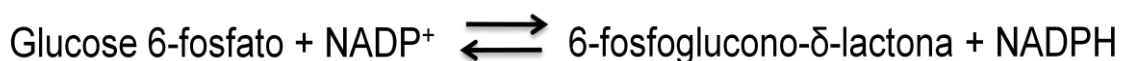


Para cada caso foi preparada uma mistura reaccional, em células de absorção molecular, composta por tampão fosfato (50 mM) pH 7,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 mM), a reacção foi iniciada com a adição da amostra da fracção citosólica com a concentração adequada de proteína (entre 0,01 e 0,025 mg/mL). Leu-se a absorvência a 240 nm, durante 180 s a 25 °C, contra um branco com a mesma composição que a mistura reaccional com excepção da amostra, num espectrómetro de absorção molecular com temperatura controlada e banho com circulação de água.

Determinámos o valor dos coeficientes angulares das rectas de reacção obtidas (r entre 0,76376 e 0,99975; Figura A.12–A.13) e a partir deles calculámos a actividade enzimática utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de  $0,0435 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.2.12.4. Glucose-6-fosfato desidrogenase

Foi determinada a actividade da glucose-6-fosfato desidrogenase na fracção citosólica, de acordo com o método proposto por Postma (1989) e Bergmeyer (1983).



Preparou-se, para cada situação, uma mistura reaccional, em células de absorção molecular, composta por Tris-HCl (1 M) pH 8,  $\text{NADP}^+$  (0,04 M),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,5 M), glucose-6-fosfato (0,1 M), a reacção foi iniciada com a adição da amostra da fracção citosólica com a concentração adequada de proteína (entre 0,2 e 0,4 mg/mL). Leu-se a absorvência a 340 nm, durante 300 s a 37 °C, contra um branco com a mesma composição que a mistura reaccional com excepção da amostra, num espectrómetro de absorção molecular com temperatura controlada e banho com circulação de água.

Determinámos o valor dos coeficientes angulares das rectas de reacção obtidas (r entre 0,99532 e 0,99988; Figura A.14–A.15) e a partir deles calculámos a actividade

enzimática utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de  $6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o NADPH.

### 3.2.12.5. Glutationo redutase

Foi determinada a actividade da glutatióno redutase na fracção citosólica, de acordo com o método proposto por Goldberg (1987) e acompanhando a oxidação do NADPH pelo decréscimo de absorvência a 340 nm.

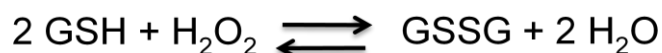


Para cada situação, preparou-se uma mistura reaccional, em células de absorção molecular, composta por tampão fosfato (0,12 mM) pH 7.2, EDTA (15 mM), GSSG (63,5 mM) e amostra da fracção citosólica com a concentração adequada de proteína (entre 0,15 e 0,5 mg/mL). Incubou-se a 37 °C durante 5 min. A reacção foi iniciada com a adição de NADPH (9,6 mM). Leu-se a absorvência a 340 nm, durante 180 s a 37 °C, contra um branco com a mesma composição que a mistura reaccional com excepção da amostra, num espectrómetro de absorção molecular com temperatura controlada e banho com circulação de água.

Determinámos o valor dos coeficientes angulares das rectas de reacção obtidas ( $r$  entre 0,97627 e 0,99955; Figura A.16–A.17) e a partir deles calculámos a actividade enzimática utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de  $6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o NADPH.

### 3.2.12.6. Glutationo peroxidase

Foi determinada a actividade da glutatióno peroxidase na fracção citosólica, de acordo com o método proposto por Flohé (1984).



Em cada situação, pré-incubou-se misturas de reacção, constituídas por tampão fosfato (70 mM) pH 7,2, GSH (500  $\mu\text{M}$ ), GR (12 mU), NADPH (160 mM) e volume adequado de amostra (20 mg/mL) em células de espectrómetro de absorção molecular, durante 10min, a 37°C, Pré-incubou-se uma mistura reaccional, em células de absorção molecular,

composta por tampão fosfato (0,12 mM) pH 7,2, GSH (5 mM), GR (0,24 U/mL), NADPH (1,6 mM) e amostra da fracção citosólica com a concentração adequada de proteína (entre 0,08 e 0,25 mg/mL), a 37 °C durante 10 min. Iniciou-se a reacção com *t*-BHP (1 mM) leu-se a absorvência a 340 nm, entre 50–80 s a 37 °C, num espectrómetro de absorção molecular com temperatura controlada e banho com circulação de água. Descontando um valor de branco que tem a mesma composição que a mistura reaccional, com a excepção do *t*-BHP que foi substituído por tampão.

Determinámos o valor dos coeficientes angulares das rectas de reacção obtidas (*r* entre 0,94346 e 0,99345; Figura A.18 – A.19) e a partir deles calculámos a actividade enzimática utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de 6,3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para o NADPH.

### **3.2.13. Análise estatística dos resultados**

Os resultados experimentais obtidos a partir de cinco experiencias independentes foram submetidos à análise de variância simples, vulgarmente conhecida por ANOVA I e posteriormente ao teste de significância de Duncan, através do Programa SPSS para Windows versão 18, licenciado para a Universidade de Évora.

### 3.3. Diagrama do trabalho



### 3.4. Material

- Caixas de petri
- Erlenmeyers
- Espátulas
- Frascos de vidro
- Filtros 0,2  $\mu$
- Filtros Whatman 1PS
- Gobelés
- Magnetos
- Micropipetas: P2, P10, P20, P100, P1000, P5000 e respectivas pontas
- Microtubos
- Pipetas de Pasteur
- Suportes
- Tubos de centrífuga
- Tubos de ensaio

### 3.5. Equipamento

- Autoclave, Selecta, Microclave
- Analisador de imagens BioRad Gel Doc EQ BioRad com software Quantity-one
- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200
- Balança micro-analítica da marca Metler, modelo AE 200
- Banho termostaticado com agitação da marca Memmert, modelo 3200 R
- Bidestilador da marca Aquatron, modelo A 4D
- Equipamento para água ultra-pura Barnstead Easy pure UV/UF
- Espectrómetro de absorção molecular de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2001, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant.
- Espectrómetro de fluorescência de feixe simples de marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC
- Estufa de incubação da marca Kowell, modelo D2-1
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca Branson Sonifier, modelo 450
- Medidor de pH da marca Hanna, modelo HI 3050 N
- Microcentrifuga da marca Beckman, modelo Microfuge E<sup>TM</sup>
- Placa de agitação da marca Labinco, modelo L34
- Supercentrifuga da marca Hermle, modelo Z323 K

- Ultracentrífuga Beckman Optima LE 80K com rotor ângulo fixo
- Vortex da marca Heidolph, modelo Reax 2000

### 3.6. Reagentes

- 1,1,3,3-tetrametoxipropano, Sigma, St. Louis
- Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37%, MERCK, Darmstadt
- Ácido etilenodiaminotetracético, Sigma, St.Louis
- Ácido metafosfórico, 33,5-36,5%, Sigma-Aldrich, St. Lois
- Ácido tiobarbitúrico, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
- Agar, para microbiologia, Sigma, St. Louis
- Azoto, Arliquido
- Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Cianeto de potássio, pró-análise, 97,0%, MERCK, Darmstadt
- Citocromo c, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Cloreto de magnésio hidratado, 99%, Sigma, St.Louis
- Di-hidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Di-hidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (sal de sódio), pró-análise, 97,0 %, Sigma, St. Louis
- Dodecilssulfato de sódio, Sigma, St. Louis
- Etanol, pró-análise (d = 0,79) 99,8%, MERCK, Darmstadt
- Extracto de levedura, para microbiologia, Sigma, St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (sal sódico) pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (sal de sódio) pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glucose, para microbiologia, Sigma, St. Louis
- Glucose-6-fosfato desidrogenase, Sigma, St.Louis
- Glutationo dissulfureto, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glutationo redutase, Sigma, St.Louis
- Glutationo, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Hidrogenocarbonato de sódio, pró-análise, 99,5%, Sigma, St.Louis
- Hidrogenofosfato de sódio anidro, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt

- Hidrogenofosfato dipotássio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- *N*-etilmaleimida, Sigma, St. Louis
- *o*-fetaldeído, Sigma, St. Louis
- Pentóxido de vanádio, pró-análise, 99,5%, Riedel-de Haen, Buchs
- Peptona, para microbiologia, Sigma, St. Louis
- Peróxido de hidrogénio, pró-análise, 30%, Sigma, St. Louis
- Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteau, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Sacarose, pró-análise, 99,5%, Sigma, St. Louis
- Sulfato de cobre, pró-análise, 99,5-102,9%, Panreac, Barcelona
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,9%,MERCK, Darmstadt
- *t*-butil hidroperóxido, Sigma, St. Louis
- Tris-(hidroximetil)-aminometano, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt



## **4. Resultados e Discussão**



#### 4.1. Efeito do pentóxido de vanádio sobre a sobrevivência celular de *S. cerevisiae*

O crescimento das culturas foi monitorizado pela medição da turbidez a 640 nm, em intervalos de 24 h, do tempo inicial até às 72 h de cultura, para três estirpes de *S. cerevisiae* (UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741) crescidas na ausência de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (meio YEPD) e na presença de 2 mM de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (meio YEPD-V) (Figura 4.1).

As três estirpes de *S. cerevisiae* cresceram em meio YEPD de forma semelhante apresentando uma curva de crescimento onde é possível observar a fase log, exponencial, bem definida até às 24 h, e de seguida observa-se uma diminuição do crescimento celular nas três estirpes, o que indica que estão a entrar em fase estacionária, provavelmente devido à escassez da fonte de carbono ou azoto no meio, bem como a acumulação de toxinas, como referido na literatura (Herman, 2002; Conim, 2008). Relativamente ao meio YEPD-V observou-se que as três estirpes apresentaram uma diminuição no crescimento celular, na presença de concentração elevada de vanádio (+5) como descrito na literatura (Willsky, 1985; Mannazzu, 2001). No entanto, como é possível observar-se na representação gráfica da curva de crescimento (Figura 4.1), a estirpe UE-ME<sub>3</sub> apresenta na fase inicial da cultura uma acentuada diminuição de crescimento relativamente ao seu controlo, mas às 48 e 72 h apresenta valores de turbidez próximos do controlo.

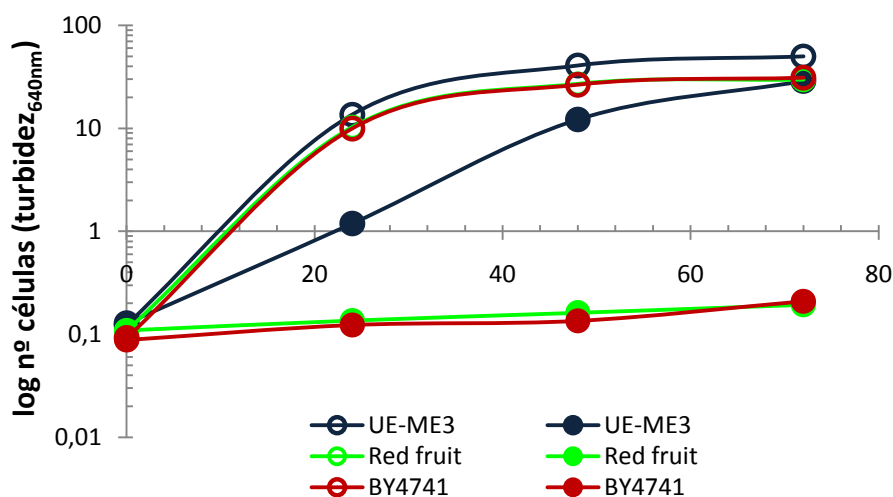


Figura 4.1: Curva de crescimento das estirpes *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 em YEPD ou YEPD-V. Crescimento das culturas acompanhado pela turbidez a 640 nm em intervalo de 24 h. Pontos sem preenchimento, meio YEPD; Pontos com preenchimento, meio YEPD-V.

A aparente adaptação da estirpe UE-ME<sub>3</sub> ao meio YEPD-V é também observada pelo número de células viáveis o qual é relativamente próximo do seu controlo, como se pode observar na imagem da placa de cfu de amostras obtidas às 48 h (Figura 4.2), bem

como pela biomassa obtida no final de 72 h de cultura pela determinação do peso seco (Figura 4.3). Esta adaptação ao vanádio pode dever-se à presença de mecanismos de desintoxicação eficazes sobre o vanádio na estirpe UE-ME<sub>3</sub>, enquanto que, as estirpes Red fruit e BY4741 apresentam crescimento celular débil em presença de vanádio (Figura 4.1-4.3), tal facto poderá dever-se a estas estirpes acumularem este metal, não sendo capazes de efectuar uma desintoxicação eficaz, como descrito para a maioria de estirpes de levedura (Bisconti, 1997; Mannazzu, 2001).

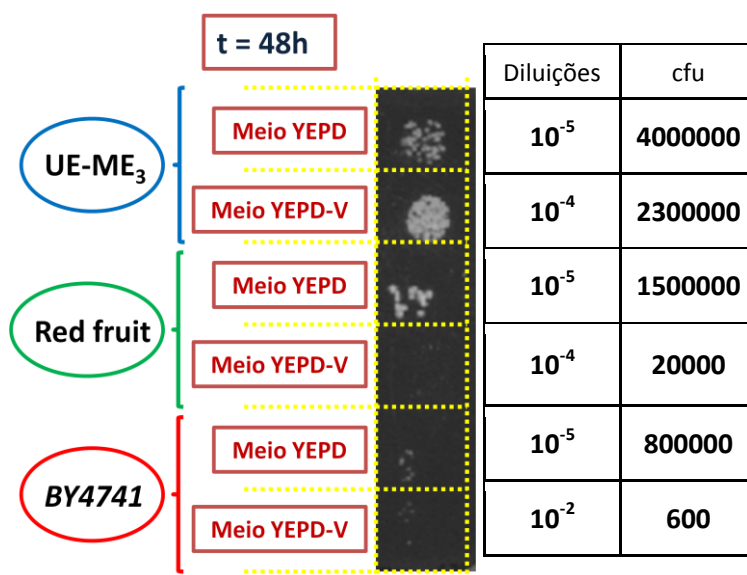


Figura 4.2: Imagem fotográfica de placa de UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 para obtenção de cfu. Células obtidas por amostragem de cultura em YEPD e YEPD-V após 48 h de crescimento.

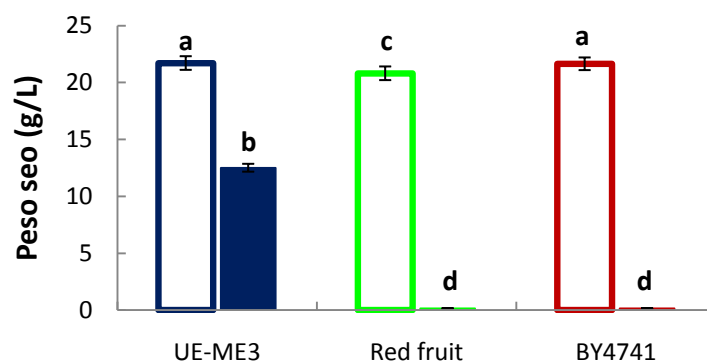
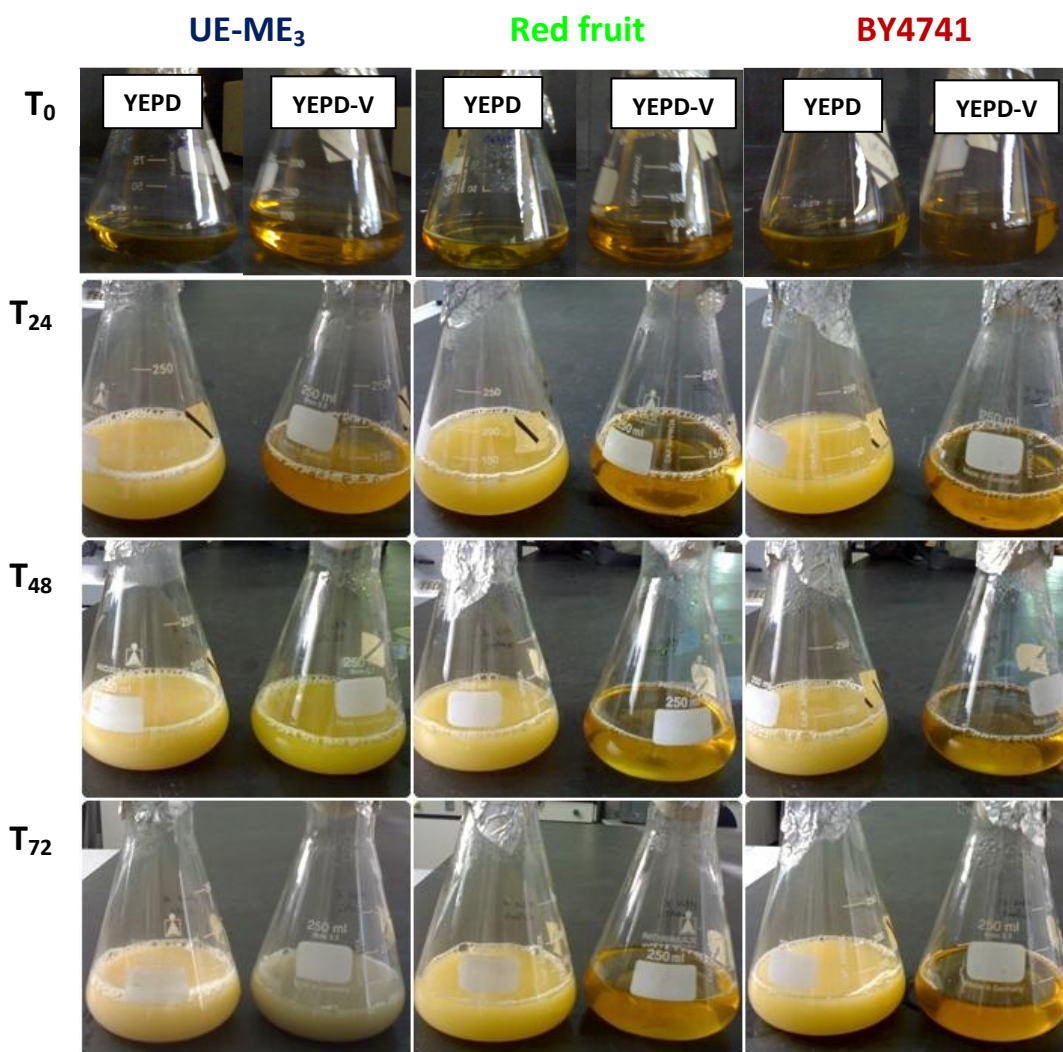


Figura 4.3: Biomassa total em peso seco produzida pelas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 crescidas em YEPD ou YEPD-V. Amostragem em cultura após 72 h de crescimento. Colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em meio YEPD, colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em meio YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes ± desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

Observou-se ainda que ao longo do tempo de cultura em YEPD-V, apenas a estirpe UE-ME<sub>3</sub> apresenta alteração na sua coloração, a qual assume um tom verde-azulado, que

se intensifica ao longo da cultura (Figura 4.4), o que poderemos associar à capacidade destas células para promoverem a conversão de vanadato (amarelo/laranja) a vanadilo (azul) (Reger, 1997). Também observou-se um aumento da turbidez no meio de cultura onde cresceu a estirpe UE-ME3 que não foi tão evidente nos meios YEPD-V onde cresceram as restantes estirpes, facto que vai ao encontro do que se observou nas curvas de crescimento, onde as estirpes Red fruit e BY4741 apresentaram crescimento muito débil.



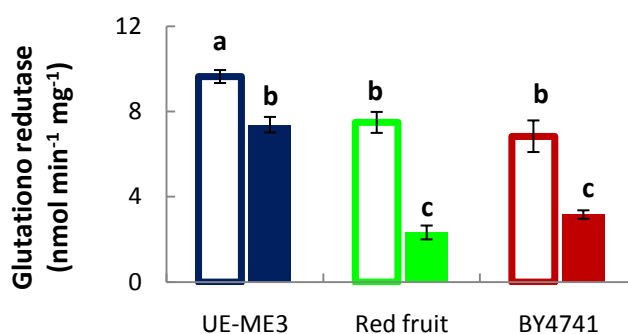
**Figura 4.4:** Registo fotográfico das culturas das estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741 ao longo do tempo. Culturas em YEPD e YEPD-V às 0 (T<sub>0</sub>), 24 (T<sub>24</sub>), 48 (T<sub>48</sub>) e 72 (T<sub>72</sub>) h de crescimento.

Assim sendo, pode-se inferir que a sobrevivência celular em presença de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> apenas observada em *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub> poderá depender da habilidade desta estirpe para converter o vanadato (+5) a vanadilo (+4) um estado de oxidação menos tóxico e de excreção mais fácil (Bisconti, 1997; Mannazzu, 2001).

## 4.2. Efeito do pentóxido de vanádio na capacidade antioxidante vs danos celulares

### Glutatio no redutase

A figura 4.5 mostra a actividade glutatio no redutase na estirpe UE-ME<sub>3</sub> crescida em YEPD é significativamente superior à das restantes estirpes, Red fruit e BY4741, crescidas no mesmo meio e que apresentaram valores que não diferem entre si ( $p < 0,01$ ). Nos ensaios de exposição ao vanádio, observou-se um decréscimo da actividade enzimática nas células crescidas em YEPD-V, comparativamente com os seus respectivos controlos, sendo mais acentuado nas estirpes Red fruit e BY4741, 69 % e 54 %, respectivamente.



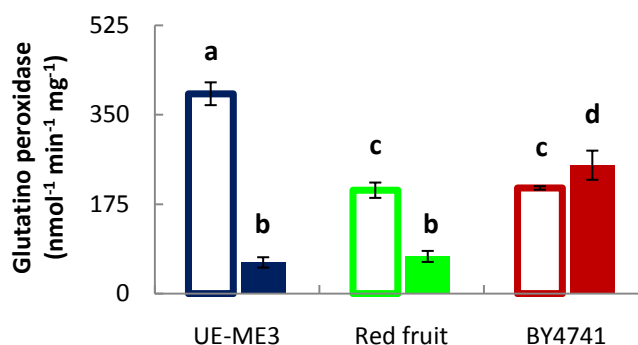
**Figura 4.5: Actividade enzimática glutatio no redutase nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.** As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

Os resultados obtidos para a actividade GR nas leveduras utilizadas neste estudo estão de acordo com o que está referenciado para *S. cerevisiae*, na fracção em estudo (Izawa, 1998).

### Glutatio no peroxidase

Na estirpe UE-ME<sub>3</sub> inoculada em YEPD a actividade glutatio no peroxidase mostrou-se significativamente superior ( $p < 0,01$ ) à das estirpes Red fruit e BY4741. Nas culturas em YEPD-V ocorreu um decréscimo significativo ( $p < 0,01$ ) desta actividade enzimática nas estirpes UE-ME<sub>3</sub> e Red fruit, comparativamente com a dos seus respectivos controlos (Figura 4.6). No caso da estirpe BY4741 observou-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) desta actividade em relação ao seu controlo, sugerindo que o GPx nesta estirpe assume papel relevante na desintoxicação de peróxidos, cuja eficácia não se revela devido ao

bloqueio do ciclo redox pelo enzima GR citoplasmático (Penninckx, 2000; Pastore, 2003; Toppo, 2009).



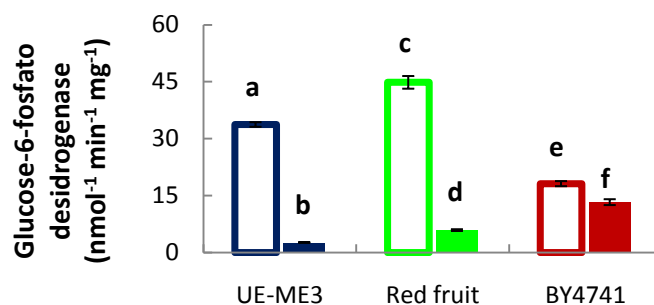
**Figura 4.6: Actividade enzimática glutatono peroxidase nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.** As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

Os resultados obtidos para a actividade GPx nas estirpes em ensaio estão de acordo com o que vem referenciado para *S. cerevisiae*, na fracção em estudo (Manfredini, 2004).

### Glucose-6-fosfato desidrogenase

A actividade glucose-6-fosfato desidrogenase na estirpe UE-ME<sub>3</sub> crescida em YEPD revelou-se significativamente inferior ( $p < 0,01$ ) à determinada em Red fruit, e significativamente superior ( $p < 0,01$ ) à determinada na BY4741 (Figura 4.7). Nos ensaios de resposta ao pentóxido de vanádio, observou-se um decréscimo significativo ( $p < 0,01$ ) desta actividade catalítica nas células crescidas em YEPD-V, comparativamente com os valores registados nos respectivos controlos, sendo bastante acentuado nas estirpes UE-ME<sub>3</sub> (92 %) e Red fruit (87 %), e menos acentuado na estirpe BY4741 (27 %). Esta resposta poderá ter uma de duas consequências: o ciclo redox do glutatono poderá sofrer um abrandamento metabólico ou o fornecimento de equivalentes redutores necessários como co-enzimas do enzima GR terem origem diferente, por exemplo *via* isocitrato desidrogenase, entre outras (Jamieson, 1998; Porter, 2000; Berg, 2002; Ramnanan, 2006).

Os resultados obtidos para a actividade G6PD nas leveduras eleitas para este estudo estão de acordo com o que vem referenciado para *S. cerevisiae* na literatura, na fracção em estudo (Izawa 1996; Izawa, 1998).



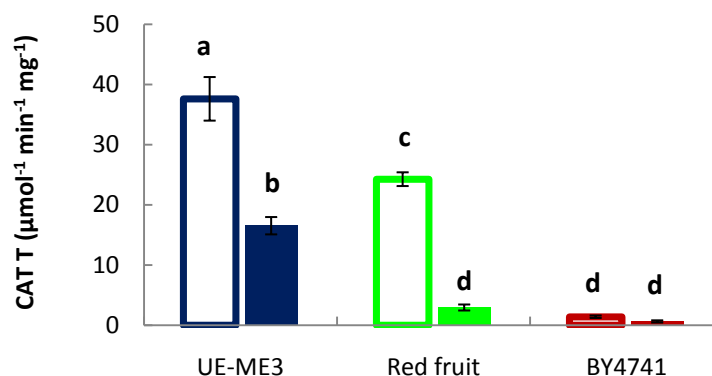
**Figura 4.7: Actividade enzimática glucose-6-fosfato desidrogenase nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.** As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

### Catalase T

A figura 4.8 mostra que a actividade catalase T na estirpe UE-ME<sub>3</sub> crescida em YEPD é significativamente superior ( $p < 0,01$ ), à detectada nas estirpes Red fruit e BY4741, facto que sugere maior importância metabólica desta actividade catalítica na remoção de peróxido e hidrogénio na estirpe UE-ME<sub>3</sub>. Por outro lado, observou-se um decréscimo significativo ( $p < 0,01$ ) desta actividade enzimática nas células UE-ME<sub>3</sub> crescidas em YEPD-V em comparação com o seu controlo (56 %). Contudo na estirpe Red fruit crescida em YEPD-V ocorreu um decréscimo altamente significativo ( $p < 0,01$ ) em relação ao seu controlo (88 %), enquanto que na estirpe BY4741, mutante na resposta antioxidante, a actividade da catalase T apresentou valores residuais nas células crescidas quer em YEPD quer em YEPD-V. Aqui também podemos especular que a resposta antioxidante na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela CAT T, na estirpe UE-ME<sub>3</sub>, à presença de vanádio (5+) no meio, poderá contribuir para a melhor sobrevivência desta estirpe ao metal, pois embora ocorra um decréscimo de actividade, esta mantêm-se em níveis muito superiores ao das outras estirpes (Herrero, 2008; Zandycke, 2002; Jamieson, 1998).

Os resultados obtidos para a actividade CAT T nas leveduras eleitas para este estudo estão de acordo com o que vem referenciado para *S. cerevisiae* na literatura (Izawa, 1996; Petrova, 2002; Manfredini, 2004).

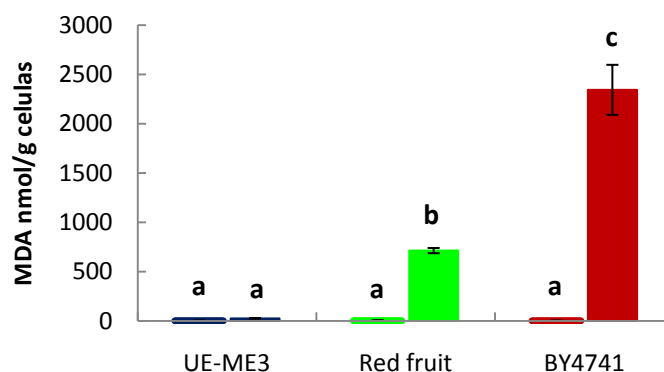




**Figura 4.8: Actividade enzimática catalase T nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.** As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

## Peroxidação lipídica

A quantificação do malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, permitiu observar que a ocorrência de danos celulares nas três estirpes assumiu valores próximos, quando apenas crescidas em YEPD (Figura 4.9) (Marnett, 1999; Dotan, 2004; Valko, 2006). No entanto, na estirpe UE-ME<sub>3</sub> crescida na presença de vanádio, não se observou um aumento significativo deste marcador, situação distinta da que aconteceu com as outras leveduras, em estudo, onde ocorreram aumentos altamente significativos (Red fruit - 200 x e BY4741 - 1200 x). Esta resposta mostra-se coerente com a perda de actividade antioxidante enzimática discutida anteriormente para a GPx e CAT T, bem como, com os parâmetros de morte celular descritos nas figuras 4.1- 4.8.



**Figura 4.9: Quantificação do MDA nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.** As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

Os resultados obtidos para a quantificação de MDA nas leveduras eleitas para este estudo estão de acordo com o que vem referenciado para *S. cerevisiae* na literatura (Espindola, 2003; Manfredini, 2004; Garre, 2010).

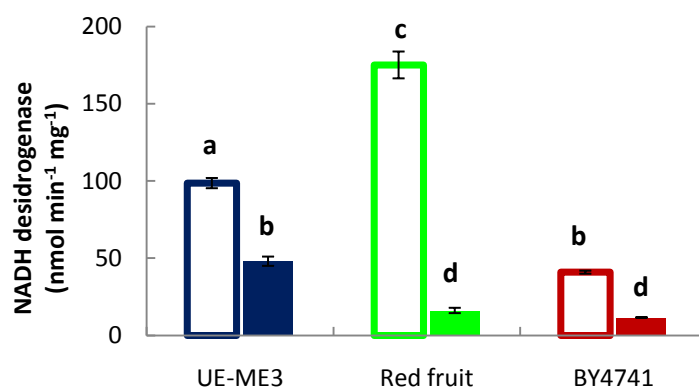
Com base nestes resultados, pode-se inferir que o  $V_2O_5$  interfere com o ciclo de oxidação-redução do glutatono bloqueando uma resposta eficaz. Embora na estirpe UE-ME<sub>3</sub> a capacidade de regeneração do GSH seja maioritariamente condicionada, pela fraca transferência de equivalentes redutores, *via* G6PD, consegue manter níveis de actividade GR superiores à das outras estirpes, podendo o ciclo mobilizar equivalentes redutores sob a forma de NADPH a partir de outras fontes metabólicas. No que diz respeito à estirpe Red fruit o ciclo de oxidação-redução parece ser fortemente bloqueado sem regeneração do GSH. Relativamente à BY4741, o bloqueio do ciclo redox deverá manifestar-se preferencialmente ao nível do GR. Apesar de o fluxo de equivalentes redutores ser menos afectado e a actividade Gpx aumentar, esta resposta não se revelou suficiente para evitar a morte celular. Estas alterações do ambiente redutor da célula criam condições para a ocorrência de morte celular, como foi descrito pela quantificação do MDA (Figura 4.9). No entanto, a estirpe UE-ME<sub>3</sub> exhibe maior capacidade de sobrevivência ao vanádio, devido a maior estabilização do ambiente redutor *via* GR, e à protecção mais eficaz contra o  $H_2O_2$  assumido pela catalase T, que desempenha um papel relevante no combate ao ROS.

### 4.3. Efeito do pentóxido de vanádio sobre NADH desidrogenase, capacidade antioxidante e ambiente lipídico do mitocondrio

#### NADH desidrogenase

A actividade enzimática NADH desidrogenase na estirpe UE-ME<sub>3</sub> crescida em meio YEPD mostrou-se significativamente inferior ( $p < 0,01$ ) ao detectado na estirpe Red fruit e significativamente superior ( $p < 0,01$ ) ao determinado na estirpe BY4741 (Figura 4.10), facto que sugere uma actividade NDI mitocondrial elevada na estirpe Red fruit.

No entanto, a resposta à exposição ao pentóxido de vanádio pelas três estirpes mostrou um decréscimo significativo ( $p < 0,01$ ) das suas actividades enzimáticas em relativamente aos seus controlos. Esse decréscimo poderá estar correlacionado com o bloqueio do fluxo de electrões na cadeia respiratória ao nível da NDI, que poderá estar acoplado com um aumento da formação de ROS, particularmente devido à formação do radical anião superóxido (Herrero, 2008; Sedensky, 2006).



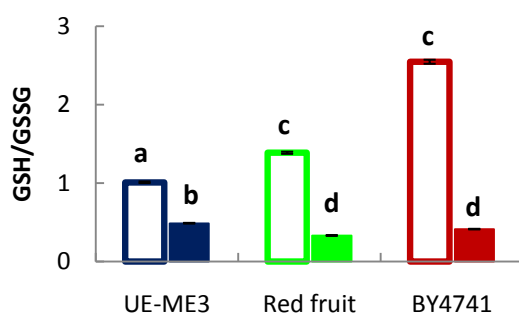
**Figura 4.10: Actividade enzimática NADH desidrogenase nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.** As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

Os resultados obtidos para a actividade NADH desidrogenase nas leveduras eleitas para este estudo estão de acordo com o que vem referenciado para *S. cerevisiae* na literatura (Ludovico, 2002; Small, 1998).

## Potencial redutor

Os valores da razão de GSH/GSSG detectados no mitocondrio das leveduras em estudo estão de acordo com o que se encontra descrito na literatura (Monteiro, 2004).

A quantificação do glutatióno e do dissulfureto de glutatióno no mitocondrio revelou que o ambiente redox neste organelo é significativamente mais oxidado ( $p < 0,01$ ) na estirpe UE-ME<sub>3</sub> do que nas estirpes Red fruit e BY4741 crescidas no meio YEPD (Figura 4.11). Contudo nas células crescidas no meio YEPD-V, ocorreu um decréscimo significativo do potencial redutor em todas as estirpes seleccionadas para o estudo ( $p < 0,01$ ), sendo mais acentuado nas estirpes Red fruit (78 %) e BY4741 (87 %). Este facto pode assegurar uma maior estabilidade mitocondrial da estirpe UE-ME<sub>3</sub> que pode ser correlacionada com a maior sobrevivência ao pentóxido e vanádio por esta estirpe, descrita na secção anterior (Jamieson, 1998; Pastore, 2003; Dalton, 2004).



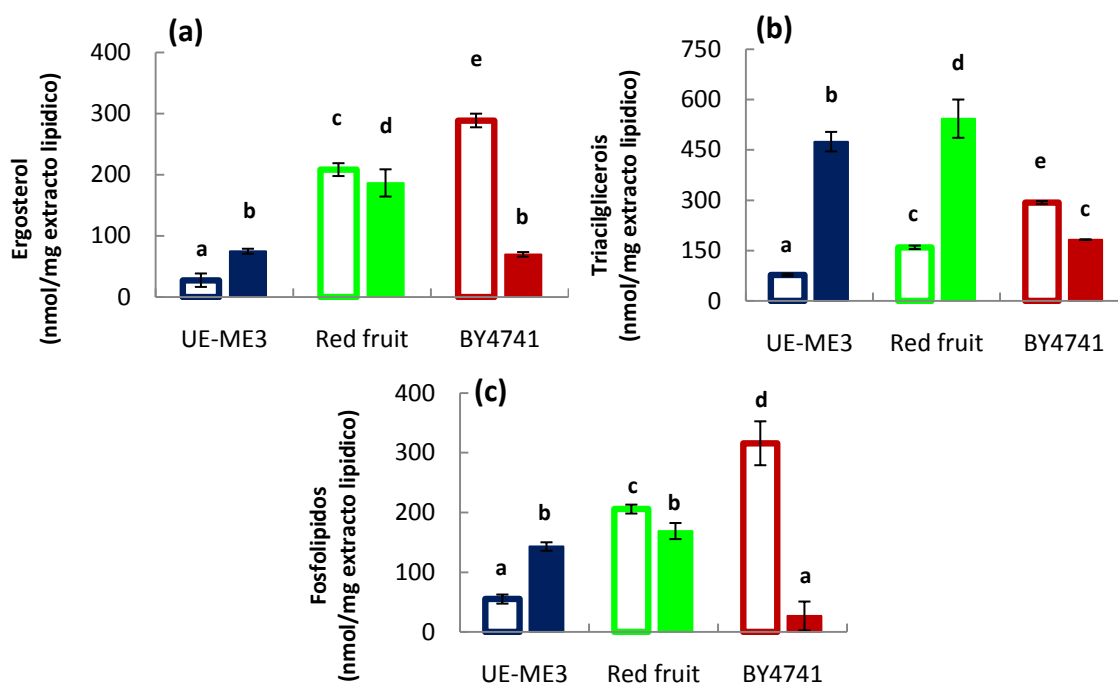
**Figura 4.11: Quantificação da razão de GSH e GSSG nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.** As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

## Ambiente lipídico

Pela figura 4.12 pode-se observar que as células da estirpe UE-ME<sub>3</sub> crescidas em YEPD apresentam nível de ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos significativamente inferiores ( $p < 0,01$ ) ao das células das estirpes Red fruit e BY4741. Contudo, as células UE-ME<sub>3</sub> em presença de vanádio exibiram um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) do nível mitocondrial de ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos, resposta que aponta para aumento da multiplicação das células sobreviventes, uma resposta positiva ao *stress* pelo metal. Na estirpe Red fruit ocorreu uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) da concentração de ergosterol e fosfolípidos e um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da concentração em triacilgliceróis, comparativamente com o seu controlo, facto que nos permite inferir perda de capacidade replicativa, mas com aumento das suas reservas lipídicas. Em relação à estirpe

BY4741 observou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) da concentração em ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos, comparativamente com o seu controlo, o que permite inferir de novo perda da capacidade replicativa, eventualmente associada à morte celular. Estes resultados podem ainda ser consubstanciados pelos valores da razão GSH/GSSG que na estirpe BY4741 e Red fruit, são significativamente inferiores aos determinados na estirpe UE-ME<sub>3</sub> (Carman, 1999; Czabany, 2007; Mannazzu, 2008; Rajakumari, 2008).

O ambiente lipídico da membrana do mitocondrio de leveduras está descrito em alguns trabalhos nos quais foi quantificado ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos (Montgomery, 2000; Sorger, 2003; Tan, 2003)



**Figura 4.12: Doseamento no extracto lipídico da membrana mitocondrial nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.** Doseamento em ergosterol (a); Doseamento em triacilgliceróis (b); Doseamento em fosfolípidos (c). As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

#### 4.4. Efeito do pentóxido de vanádio sobre a NADPH P450 desidrogenase e ambiente lipídico microssomal

##### NADPH P450 desidrogenase

Os resultados obtidos para a actividade NADPH P450 desidrogenase nas leveduras eleitas para este estudo estão de acordo com o que vem referenciado para *S. cerevisiae* na literatura (Venkateswarlu, 1998).

Os valores desta actividade catalítica determinados na estirpe BY4741 crescida em YEPD apresentaram-se significativamente superiores ( $p < 0,01$ ) aos determinados na estirpe UE-ME<sub>3</sub> e Red fruit (Figura 4.13). Contudo nas células UE-ME<sub>3</sub> crescidas em YEPD-V observou-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) desta actividade catalítica do retículo endoplasmático, por estar provavelmente envolvido na excreção/metabolização do V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, e consequentemente contribuir para o aumento de ROS intracelular. Todavia, na estirpe Red fruit não se observaram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as células crescidas em YEPD e as que cresceram em YEPD-V. Relativamente à estirpe BY4741 observou-se também um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da actividade NADPH (P450) desidrogenase, nas células crescidas em YEPD-V, resposta que supomos também contribuir para o aumento de ROS intracelular (Puntarulo, 1998; Portal, 2008; Laursen, 2010).

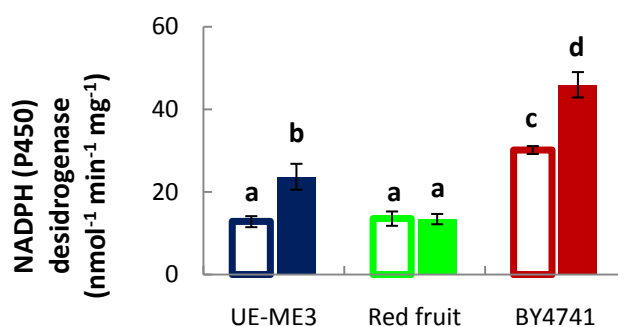
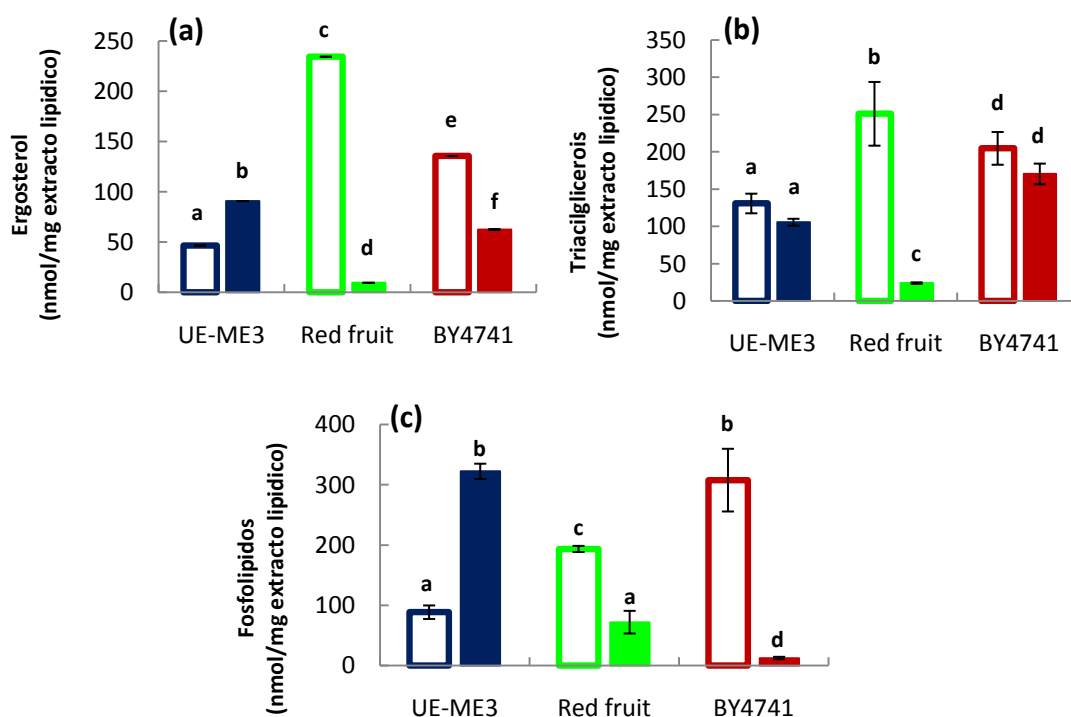


Figura 4.13: Actividade enzimática NADPH (P450) desidrogenase das estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741. As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

##### Ambiente lipídico

Na estirpe UE-ME<sub>3</sub> crescida em YEPD-V observou-se ainda um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) do nível de ergosterol e fosfolípidos (Figura 4.14), não se tendo registado diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) na concentração de triacilgliceróis, relativamente ao seu

controlo, resposta que leva a inferir um aumento na capacidade proliferativa nessas células que inclui produção de retículo endoplasmático, facto que suporta uma melhor sobrevivência deste tipo de células à presença de vanádio no meio de cultura. Em relação à estirpe Red fruit crescida em YEPD-V observou-se um decréscimo significativo ( $p < 0,01$ ) acentuado da concentrações de ergosterol (96 %), triacilgliceróis (90 %) e fosfolípidos (63 %), relativamente ao seu controlo, enquanto que nas células da estirpe BY4741 crescida em YEPD-V observou-se um decréscimo significativo ( $p < 0,01$ ) na concentração em ergosterol e fosfolípidos, mas não ocorreram alterações significativas ( $p < 0,01$ ) na concentração de triacilgliceróis, comparativamente com seu controlo, resposta que nos leva a inferir nos dois casos a ocorrência de morte celular com consumo de reservas lipídicas no caso da estirpe Red fruit (Carman, 1999; Czabany, 2007; Rajakumari, 2008).



**Figura 4.14: Doseamento no extrato lipídico da membrana do retículo endoplasmático nas estirpes UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.** Doseamento em ergosterol (a); Doseamento em triacilgliceróis (b); Doseamento em fosfolípidos (c). As colunas sem preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD, as colunas com preenchimento correspondem às células crescidas em YEPD-V. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes  $\pm$  desvio-médio. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).





## **5. Conclusões**



O desenvolvimento deste trabalho experimental pretendia avaliar e compreender a resposta exibida por três estirpes de *S. cerevisiae*: UE-ME<sub>3</sub> (vínica nativa do Alentejo), Red fruit (vínica comercial) e BY4741 (comercial para investigação), ao agente químico pentóxido de vanádio, em termos de sobrevivência celular, sistemas de transporte de electrões e ambiente lipídico do retículo endoplasmático e do mitocondrio, bem como, defesas enzimáticas e não-enzimáticas antioxidantes.

Os marcadores de sobrevivência celular ao V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, como a turbidez do meio de cultura, cfu, peso seco às 72 h de crescimento e MDA citoplasmático, um produto da peroxidação lipídica, avaliados em *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741, mostraram que o pentóxido de vanádio causou inibição do crescimento celular das três estirpes eleitas para este estudo. Contudo a estirpe UE-ME<sub>3</sub>, nativa de mostos alentejanos, manifestou uma resposta adaptativa à presença do metal, por eventualmente dispor de mecanismos de desintoxicação capazes de converter o vanadato (+5) em vanadilo (+4), uma espécie química de mais fácil excreção.

Os estudos efectuados para avaliar a capacidade antioxidante citoplasmática sugerem que as actividades glutathione redutase, principal responsável pela reposição do glutathione intracelular e manutenção da razão GSH/GSSG; glutathione peroxidase, um selenoenzima envolvido na remoção de lipoperóxidos, bem como, a actividade glucose-6-fosfato desidrogenase, o principal gerador de equivalentes redutores necessários ao funcionamento do ciclo de oxidação-redução do glutathione constituíram alvos relevantes do pentóxido de vanádio. O decréscimo acentuado da actividade glutathione redutase nas três estirpes pode justificar em parte o débil crescimento das estirpes Red fruit e BY4741 e condicionar a resposta adaptativa da estirpe nativa UE-ME<sub>3</sub>, aquela onde o efeito sobre esta actividade catalítica foi muito inferior, facto que poderá ter facilitado uma melhor estabilização do ambiente redutor intracelular pelo ciclo de oxidação-redução do glutathione.

Apesar de o pentóxido de vanádio não afectar significativamente a remoção de peróxidos, via GPx na estirpe BY4741, esta não se adapta à presença do metal no meio de cultura, devido à resposta antioxidante não ser concertada com a resposta da CAT T que diminuiu drasticamente nas células desta estirpe em presença de vanádio.

Por outro lado, a adaptação ao pentóxido de vanádio pela estirpe UE-ME<sub>3</sub>, parece também ser garantida pelo efeito protector do enzima CAT T, na remoção do ROS citoplasmático, actividade que sofreu um decréscimo menos acentuado nesta estirpe, preservando-a do incremento da peroxidação lipídica, observado em células Red fruit e BY4741.

Segundo a literatura, em condições fisiológicas as três NADH desidrogenases, NDI I, NDE I e NDE II, da cadeia respiratória de leveduras, constituem a principal fonte intracelular de ROS, particularmente devido à libertação do radical anião superóxido para o ambiente

celular, pelo que o decréscimo da actividade NADH desidrogenase, provocado pelo pentóxido de vanádio nas três estirpes estudadas poderá ter bloqueado o fluxo de electrões na cadeia respiratória ao nível da NDI causado um aumento de ROS intracelular.

A quantificação da razão GSH/GSSG que avalia o ambiente redox intracelular, nas três estirpes expostas ao pentóxido de vanádio permitiu inferir que o composto metálico torna o ambiente intra-mitocondrial mais oxidante, devido ao decréscimo da razão GSH/GSSG mitocondrial, um marcador de stress oxidativo e morte celular. No entanto, esta resposta mostrou-se menos acentuada na estirpe UE-ME<sub>3</sub>, facto que parece revelar maior estabilidade nos mitocondrios da estirpe UE-ME<sub>3</sub> e que também pode justificar em parte a maior sobrevivência ao pentóxido e vanádio por estas células.

O aumento do conteúdo em ergosterol, triacilgliceróis e fosfolípidos mitocondriais em células UE-ME<sub>3</sub> crescidas na presença de vanádio, apontam para um aumento da multiplicação das células sobreviventes e corroboram a resposta adaptativa desta estirpe ao metal, factos que não foram observados nas estirpes Red fruit e BY4741 que de novo revelaram perda da capacidade replicativa e morte celular, já inferidas anteriormente pelo decréscimo acentuado da razão GSH/GSSG, bem como, pelo aumento da quantidade de malonodialdeído em células destas estirpes expostas ao vanádio.

Admitindo que alterações na composição lipídica mitocondrial de células UE-ME<sub>3</sub> reflectem modificações em termos de hidrofobicidade, permeabilidade e rigidez membranar, pode-se considerar que esse tipo de resposta ao agente de *stress* poderá ter contribuído também para aumentar a estabilidade membranar mitocondrial, criando um ambiente mais favorável ao funcionamento do enzima NADH desidrogenase e conseqüentemente da cadeia respiratória, com menor geração de ROS, factos que podem também justificar em parte a melhor sobrevivência desta estirpe ao vanádio.

O aumento da actividade NADPH (P450) desidrogenase do retículo endoplasmático, provavelmente envolvida na excreção/metabolização do vanádio em leveduras UE-ME<sub>3</sub> e BY4741, leva-nos a admitir que o retículo endoplasmático constitui uma fonte adicional de ROS na resposta destas duas estirpes ao metal.

O aumento do conteúdo em ergosterol e fosfolípidos do retículo endoplasmático, em células UE-ME<sub>3</sub> crescidas na presença de vanádio, sugere mais uma vez um aumento da estabilidade membranar, com criação de um ambiente mais favorável ao funcionamento do enzima NADPH (P450) desidrogenase e à resposta excretória do vanádio nesta estirpe de levedura.

Assim podemos concluir que a levedura vínica nativa do Alentejo, *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub> apresentou maior tolerância ao vanádio do que a vínica comercial e comercial para investigação, provavelmente por dispor de mecanismos de resposta ao *stress* mediados pelo glutatióno, com maior robustez do que aqueles que foram detectados nas estirpes Red

fruit e BY4741. Por outro lado, a NADH desidrogenase mitocondrial e NADPH desidrogenase microsomal mostraram-se menos sensíveis ao pentóxido de vanádio, pelo que, pode supor-se que a interrupção parcial da cadeia respiratória ou activação de enzimas microsomais deram uma menor contribuição para a formação de ROS intracelular. Deste modo, os resultados obtidos com a estirpe *S. cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub> encorajam a continuação de estudos de toxicologia ambiental e também a sua eventual aplicação em biorremediação de compostos metálicos, em particular, derivados de metais de transição.



## 6. Referências bibliográficas

- Abe, F. e Hiraki, T. (2009) - **Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae***, *Biochim Biophys Acta*, 1788, 743-752.
- Allain, C.; Poon, L.; Chan, C.; Richmond, D. e Fu, P. (1974) - **Enzymatic determination of total serum cholesterol**, *Clin Chem*, 20, 470-475.
- Atlas RM (2006) **Handbook of microbiological media for the examination of food**, 2<sup>nd</sup> ed. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, p 403.
- Avery, A.M. e Avery, S.V. (2001) - ***Saccharomyces cerevisiae* Expresses Three Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidases**, *J. Biol. Chem.*, 276, 33730–33735.
- Bartosz, G. (2009) - **Reactive oxygen species: Destroyers or messengers**, *Biochemical Pharmacology*, 77, 1303-1315.
- Beers, R.; Jr., Sizer, I. (1952) - **A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase**, *J. Biol. Chem.*, 195, 133-140.
- Bell, J.M.L., Philp, J.C., Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Dunbar, S.A., Cunningham, C.J. e Anderson, P. (2004) - **Methods evaluating vanadium tolerance in bacteria isolated from crude oil contaminated land**, *Journal of Microbiological Methods*, 58, 87– 100.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. e Stryer, L. (2002) – **Biochemistry**, 5<sup>th</sup> Ed., W. H. Freeman and Company, New York.
- Bergmeyer, H. e Grabl, M. (1983) – **Method of Enzymatic Analysis, Volume II, Samples, Reagents, assessment of Results**, 3rd ed., Verlag Chemie, Florida.
- Bisconti, L., Pepi, M., Mangani, S. e Baldi, F. (1997) - **Reduction of vanadate to vanadyl by a strain of *Saccharomyces cerevisiae***, *BioMetals*, 10, 239-246.
- Carman, G.M. e Henry, S.A. (1999) - **Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes**, *Progress in Lipid Research*, 38, 361-399.
- Cipak, A., Hasslacher, M., Tehlivets, O., Collinson, E.J., Zivkovic, M., Matijevic, T., Wonisch, W., Waeg, G., Dawes, I.W., Zarkovic, N. e Kohlwein, S.D. (1996) - ***Saccharomyces cerevisiae* strain expressing a plant fatty acid desaturase produces polyunsaturated fatty acids and is susceptible to oxidative stress induced by lipid peroxidation**, *Free Radical Biology & Medicine*, 40, 897 – 906.
- Conim, A. (2008) - **Influência da fase de crescimento na resposta ao pentóxido de vanádio por desidrogenases de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>**, Relatório de estágio, Universidade de Évora, Évora.
- Costa, V. e Moradas-Ferreira, P. (2001) – **Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into, ageing, apoptosis and diseases**, *Mol Aspects of Medicine*, 22, 217-246.
- Czabany, T., Athenstaedt, K. e Daum, G. (2007) - **Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast**, *Biochim Biophys Acta*, 1771, 299–309.
- Dalton, T.P., Chen, Y., Schneider, S.N., Nebert, D.W. E Shertzer, H.G. (2004) - **Genetically Altered Mice To Evaluate Glutathione Homeostasis In Health And Disease**, *Free Radical Biology & Medicine*, 37, 1511–1526.

- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M. e Dickson, R. (1998) - **Biochemistry, Cell Biology and Molecular Biology of Lipids of *Saccharomyces cerevisiae***, *Yeast*, 14, 1471–1510.
- Daum, G., Wagner, A., Czabany, T. e Athenstaedt, K. (2007) - **Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast**, *Biochimie*, 89, 243-248.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D. e Pinchuk, I. (2004) - **Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress**, *Progress in Lipid Research*, 43, 200–227.
- Durfinová, M.; Brechtlová, M.; Líška, B. e Barošková, Z. (2007) - **Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in rat brain tissues**, *Chemical Papers*, 61, 1336-9075.
- Espindola, A.S., Gomes, D.S., Panek, A.D. e Eleutherio, E.C.A. (2003) - **The role of glutathione in yeast dehydration tolerance**, *Cryobiology*, 47, 236–241.
- Evangelou, A.M. (2002) - **Vanadium in cancer treatment**, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42, 249–265.
- Fang, J. e Beattie, D.S. (2003) - **External Alternative NADH Dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: A potential source of superoxide**, *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 478–488.
- Ferreira R, Alves-Pereira I, Magriço S, Ferraz-Franco C (2006) - **Comparative effects of  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  on detoxication enzymes and redox state of wine *Saccharomyces***. In: Collery P (ed) Metal ions in biology and medicine, vol 9. John Libbey Eurotext, Paris, pp 169–174.
- Flohé, L. e Gunzler, W. (1984) – **Assay of glutathione peroxidase**, *Methods Enzymol*, 105, 114-121.
- Folch, J., Lees, M. e Stanley, G.H. (1957) - **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues**, *J. Biol. Chem.*, 1, 497-509.
- Fossati, P. e Prencipe, L. (1982) - **Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide**, *Clinical Chemistry*, 28, 2077-2080
- França, M.B., Panek, A.D. e Eleutherio, E.C.A. (2007) - **Oxidative stress and its effects during dehydration**, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146, 621–631.
- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A. e Matallana, E. (2010) - **Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts**, *International Journal of Food Microbiology*, 136, 295–303.
- Goldberg, D. e Spooner, R. (1987) – **Gluthione reductase**, in Methods of enzymatic analysis, 3<sup>rd</sup> ed., 258-265, Bergmayer, VCH, New York.
- Grant, C.M., Maclver, F.H. e Dawes, I.W. (1996) - **Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***, *Curr Genet*, 29, 511–515.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (2007) - **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4th ed., Oxford University Press.
- Henderson, G.E., Evans, I.H. e Bruce, I.J. (1989<sup>a</sup>) - **Vanadate inhibition of mitochondrial respiration and H<sup>+</sup> ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae***, *Yeast*, 5, 73-7.
- Henderson, G.E., Evans, I.H. e Bruce, I.J. (1989<sup>b</sup>) - **The effects of vanadate on the yeast *Saccharomyces cerevisiae***, *Antonie van Leeuwenhoek*, 55, 99-107.
- Herdeiro, R.S., Pereira, M.D., Panek, A.D. e Eleutherio, E.C.A. (2006) - **Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress**, *Biochim Biophys Acta*, 1760, 340–346.



- Herman, P.K. (2002) - **Stationary phase in yeast**, *Current Opinion in Microbiology*, 5, 602–607.
- Hernández-García, D., Wood, C.D., Castro-Obregón, S. e Covarrubias, L. (2010) - **Reactive oxygen species: A radical role in development**, *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 130–143.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. e Cabisco, E. (2008) - **Redox control and oxidative stress in yeast cells**, *Biochim Biophys Acta*, 1780, 1217–1235.
- Hissin, P.J., Hilf, R. (1976) - **A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues**, *Annals Biochem*, 74, 214-226.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S. e Kimura, A. (1999) - **Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae***, *J. Biol. Chem.*, 274, 27002–27009.
- Izawa, S., Inoue, Y. e Kimura, A. (1996) - **Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae***, *Biochem. J.*, 320, 61-67
- Izawa, S., Maeda, K., Miki, T., Mano, J., Inoue, e Kimura, A. (1998) - **Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae***, *Biochem. J.*, 330, 811-817.
- Jakubowski, W., Bilinski, T. e Bartosz, G. (2000) - **Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces Cerevisiae***, *Free Radical Biology & Medicine*, 28, 659–664.
- Jamieson, D.J. (1998) - **Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae***, *Yeast*, 14, 1511–1527.
- Jia, Z., Zhu, H., Misra, H.P. e Li, Y. (2008) - **Potent induction of total cellular GSH and NQO1 as well as mitochondrial GSH by 3H-1,2-dithiole-3-thione in SH-SY5Y neuroblastoma cells and primary human neurons: Protection against neurocytotoxicity elicited by dopamine, 6-hydroxydopamine, 4-hydroxy-2-nonenal, or hydrogen peroxide**, *Brain Research*, 1197, 159-169.
- Kho, C.W., Park, S.G., Lee, H., Cho, S., Oh, G.T., Kang, S. e Park, B.C. (2004) - **Activity Staining of Glutathione Peroxidase after Two-dimensional Gel Electrophoresis**, *Molecules and Cells*, 18, 369-373.
- Kusch, H., Engelmann, S., Bode, R., Albrecht, D., Morschhauser, J. e Hecker, M. (2008) - **A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases**, *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 291–318.
- Lake, B.G. (1987) – **Biochemical toxicology a practical approach**, Edited by K Snell & B Mullock, Oxford. Washington DC
- Laursen, T. Jensen, K. e Møller, L. (2010) - **Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450**, *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.07.003.
- López-Mirabal, H.R. e Winther, J.R. (2008) - **Redox characteristics of the eukaryotic cytosol**, *Biochim Biophys Acta*, 1783, 629–640.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, J., Farr, A.L. e Randall, R.J. (1951) – **Protein measurement with folin phenol reagent**, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275
- Lu, S.C. (2009) - **Regulation of glutathione synthesis**, *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 42–59.
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M.T., Barrientos, A. e Côrte-Real, M.(2002) - **Cytochrome c Release and Mitochondria Involvement in Programmed Cell Death**

**Induced by Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae***, *Molecular Biology of the Cell*, 13, 2598–2606.

Luttik, M.A.H., Overkamp, K.M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J.P. e Pronk, J.T. (1998) - **The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 Genes Encode Separate Mitochondrial NADH Dehydrogenases Catalyzing the Oxidation of Cytosolic NADH**, *J. Biol. Chem.*, 273, 24529–24534.

Mager, W.H. e Winderickx, J. (2005) - **Yeast as a model for medical and medicinal research**, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 26, 265–273.

Mandiwana, K.L. e Panichev, N. (2010) - **Analysis of soil reference materials for vanadium (+5) species by electrothermal atomic absorption spectrometry**, *Journal of Hazardous Materials*, 178, 1106–1108.

Manfredini, V., Roehrs, R., Peralba, M.C.R., Henriques, J.A.P., Saffi, J., Ramos, A.L.L.P. e Benfato, M.S. (2004) – **Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* sod1 $\Delta$  sod2 $\Delta$  double mutants against oxidative damage**, *Brazilian Journal of Medical and biological research*, 37, 159–165.

Mannazzu, I. (2001) - **Vanadium detoxification and resistance in yeast: a minireview**, *Annals of Microbiology*, 51, 1–9.

Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M. Farris, G.A., Goffrini, P., Lodi, T., Marzona, M. e Bardi, L. (2008) - **Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity**, *International Journal of Food Microbiology*, 121, 84–91.

Mannazzu, I., Guerra, E., Ferretti, R., Pediconi, D. e Fatichenti, F. (2000) - **Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha***, *Biochim Biophys Acta*, 1475, 151–156.

Marnett, L.J. (1999) - **Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde**, *Mutation Research*, 424, 83–95

Meister, A. (1988) - **Glutathione Metabolism and Its Selective Modification**, *J. Biol. Chem.*, 263, 17205–17208.

Monteiro, G., Kowaltowski, A.J., Barros, M.H. e Netto, L.E.S. (2004) - **Glutathione and thioredoxin peroxidases mediate susceptibility of yeast mitochondria to Ca<sup>2+</sup>-induced damage**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 425, 14–24.

Montgomery, H.J., Monreal, C.M., Young, J.C. e Seifert, K.A. (2000) - **Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses**, *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 1207–1217.

Monti, D., Baldaro, E. e Riva, S. (2003) - **Separation and characterization of two catalase activities isolated from the yeast *Trigonopsis variabilis***, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 596–605.

Moskalyk, R.R. e Alfantazi, A.M. (2003) - **Processing of vanadium: a review**, *Minerals Engineering*, 16, 793–805.

Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A. e Remmen, H.V. (2007) - **Trends in oxidative aging theories**, *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 477–503.

Nie, Y., He, J.L. e Hsia, S.L. (1993) - **A micro enzymic method for determination of choline-containing phospholipids in serum and high density lipoproteins**, *Lipids*, 28, 949–951.

Ohkawa, H.; Ohishi, N. e Yagi, K. (1979) - **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction**, *Annals Biochem*, 95, 351–358.

- Overkamp, K.M., Bakker, B.M., Kotter, P., Van Tuijl, A., De Vries, S., Van Dijken, J.P. e Pronk, J.T. (2000) - **In Vivo Analysis of the Mechanisms for Oxidation of Cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria**, *J. Bacteriol.*, 182, 2823–2830.
- Owen, J.B. e Butterfield, D.A. (2010) - **Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio**, *Methods Mol Biol.*, 648, 269–277.
- Park, J.S., Li, Y. e Bai, Y. (2007) - **Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation**, *Biochim Biophys Acta*, 1772, 533–542.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. e Piemonte, F. (2003) - **Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification**, *Clinica Chimica Acta*, 333, 19–39.
- Penninckx, M. (2000) - **A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses**, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 737–742.
- Perricone, C., De Carolis, C. e Perricone, R. (2009) - **Glutathione: A key player in autoimmunity**, *Autoimmunity Reviews*, 8, 697–701.
- Perrone, G.G., Tan, S.X. e Dawes, I.W. (2008) - **Reactive oxygen species and yeast apoptosis**, *Biochim Biophys Acta*, 1783, 1354–1368.
- Petrova, V.Y., Rasheva, T.V. e Kujumdzieva, A.V. (2002) - **Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae***, *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, 1-13
- Portal, P., Villamil, S.F., Alonso, G.D., De Vas, M.G., Flawia, M.M., Torres, H.N. e Paveto, C. (2008) - **Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi* suggested role on drug resistance**, *Molecular & Biochemical Parasitology*, 160, 42–51.
- Postma (1989) - **Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae***, *Appl Environ Microbiol*, 55, 468.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. e Klein, D.A. (2005) – **Microbiology**, Sixth edition, McGraw Hill.
- Puntarulo, S. e Cederbaum, A.I. (1998) - **Production of Reactive Oxygen Species by Microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes**, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 1324–1330.
- Rajakumari, S., Grillitsch, K. e Daum, G. (2008) - **Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast**, *Progress in Lipid Research*, 47, 157–171.
- Ramnanan, C.J. e Storey, K.B. (2006) - **Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation during hypometabolism**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339, 7–16.
- Reger, D., Goode, S. e Mercer, E. (1997) - **Química: princípios e aplicações**, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Richter, C. (1997) – **Free-radical mediated DNA oxidation**. In: Wallace, K. B. (Ed), *Free Radical Toxicology*, Taylor & Francis, 89-113.
- Rikans, L.E. e Hornbrook, R. (1997) - **Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging**, *Biochim Biophys Acta*, 1362, 116–127.
- Rosado, T. (2008) - **Resposta bimodal ao pentóxido de vanádio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>**, Relatório de trabalho de projecto de Laboratórios II, Universidade de Évora, Évora.
- Rosado, T., Conim, A., Alves-Pereira, I. e Ferreira, R. (2009) - **Vanadium pentoxide effects on stress responses in wine *Saccharomyces cerevisiae* strain UE-ME<sub>3</sub>**, *Ecotoxicology*, 18, 1116–1122.

- Schnabl, M., Daum, G. e Pichler, H. (2005) - **Multiple lipid transport pathways to the plasma membrane in yeast**, *Biochim Biophys Acta*, 1687, 130–140.
- Seah, T.C.M. e Kaplan, J.G. (1973) - **Purification and Properties of the Catalase of Bakers' Yeast**, *J. Biol. Chem.*, 248, 2889-2893.
- Sedensky, M.M. e Morgan, P.G. (2006) - **Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants**, *Experimental Gerontology*, 41, 237–245.
- Shin, E.S., Park, J., Shin, J., Cho, D., Cho, S.Y., Shin, D.W., Ham, M., Kim, J.B. e Lee, T.R. (2008) - **Catechin gallates are NADP<sup>+</sup>-competitive inhibitors of glucose-6-phosphate dehydrogenase and other enzymes that employ NADP<sup>+</sup> as a coenzyme**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 3580–3586.
- Small, W.C. e Mcalister-Henn, L. (1998) - **Identification of a Cytosolically Directed NADH Dehydrogenase in Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae***, *J. Bacteriol.*, 180, 4051–4055
- Sorger, D. e Daum, G. (2003) - **Synthesis of Triacylglycerols by the Acyl-Coenzyme A:Diacyl-Glycerol Acyltransferase Dga1p in Lipid Particles of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae***, *J. Bacteriol.*, 184, 519–524.
- Takayama, M., Itoh, S., Nagasaki, T. e Tanimizu, I. (1977) - **A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids**, *Clin Chim Acta*, 79, 93-98.
- Tan, T., Zhang, M. e Gao, H. (2003) - **Ergosterol production by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae***, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 366–370.
- Temple, M.D., Perrone, G.G. e Dawes, I.W. (2005) - **Complex cellular responses to reactive oxygen species**, *TRENDS in Cell Biology*, 15, 319-326.
- Thompson, K.H. e Orvig, C. (2001) - **Coordination chemistry of vanadium in metallopharmaceutical candidate compounds**, *Coordination Chemistry Reviews*, 219–221, 1033–1053.
- Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S. e Maiorino, M. (2009) - **Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme**, *Biochim Biophys Acta*, 1790, 1486–1500.
- Tsuzi, D., Maeta, K., Takatsume, Y., Izawa, S. e Inoue, Y. (2004) - **Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7**, *FEBS Letters*, 565, 148–154.
- Turton, H.; Dawes, I.; Grant, C. (1997) - ***Saccharomyces cerevisiae* Exhibits a yAP-1-Mediated Adaptive Response to Malondialdehyde**, *J. Bacteriol.*, 1096–1101.
- Tzagoloff, A. (1971) - **Assembly of the Mitochondrial Membrane System - IV. Role of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis in the biosynthesis of the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase**, *J. Biol. Chem.*, 246, 3050-3056.
- Vachirapatama, N., Dicinowski, G.W., Townsend, A.T. e Haddad, P.R. (2002) - **Determination of vanadium as 4-(2-pyridylazo)resorcinol–hydrogen peroxide ternary complexes by ion-interaction reversed-phase liquid chromatography**, *Journal of Chromatography A*, 956, 221–227.
- Valentine, J.S., Wertz, D.L., Lyons, T.J., Liou, L.L., Goto, J.J. e Gralla, E.B. (1998) - **The dark side of dioxygen biochemistry**, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 253-262.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. e Mazur, M. (2006) - **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer**, *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.

Velázquez, I. e Pardo, J.P. (2001) - **Kinetic Characterization of the Rotenone-Insensitive Internal NADH: Ubiquinone Oxidoreductase of Mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae***, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 389, 7–14.

Venkateswarlu, K., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J. e Kelly, S.L. (1998) – **The N-Terminal Membrane Domain of Yeast NADPH-Cytochrome P450 (CYP) Oxidoreductase Is Not Required for Catalytic Activity in Sterol Biosynthesis or in Reconstitution of CYP Activity**, *J. Biol. Chem.*, 273, 4492–4496.

Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G.C. e Singer, R.A. (1993) - **Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae***, *Microbiological Reviews*, 57, 383-401.

Willisky, G.R., Leung, J.O., Offermann, P.V., Jr., Plotnick, E.K. e Dosch, E.K. (1985) - **Isolation and Characterization of Vanadate-Resistant Mutants of *Saccharomyces cerevisiae***, *J. Bacteriol.*, 164, 611-617.

Wriessnegger, T., Leitner, E., Beleggratis, M.R., Ingolic, E. e Daum, G. (2009) - **Lipid analysis of mitochondrial membranes from the yeast *Pichia pastoris***, *Biochim Biophys Acta*, 1791, 166–172.

Zandycke, S.M.V., Sohler, P.J. e Smart, K.A. (2002) - **The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae***, *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 365–373.

#### **Webgrafia:**

<http://en.wikipedia.org/wiki/Vanadium>, acedido dia 23 de Setembro de 2010

<http://www.bio.ilstu.edu/Edwards/Projects/P450.shtml>, acedido dia 23 de Setembro de 2010

Expasy, [www.expasy.org](http://www.expasy.org)



**A. ANEXOS**





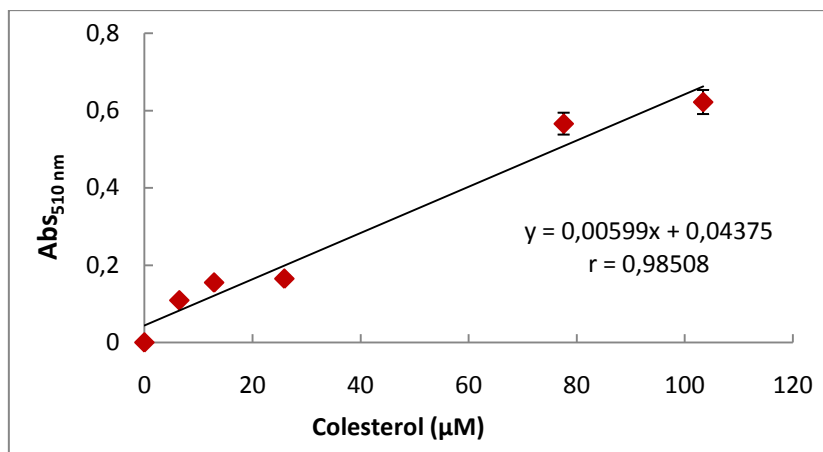


Figura A.1: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na quantificação de ergosterol, utilizando uma solução padrão de colesterol (0 - 100 μM)

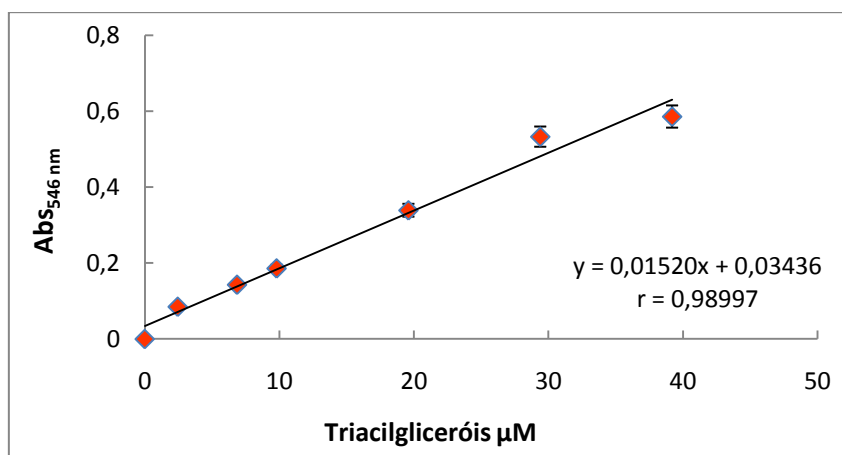


Figura A.2: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na quantificação de triacilgliceróis, utilizando uma solução padrão de triacilgliceróis (0 - 40 μM)

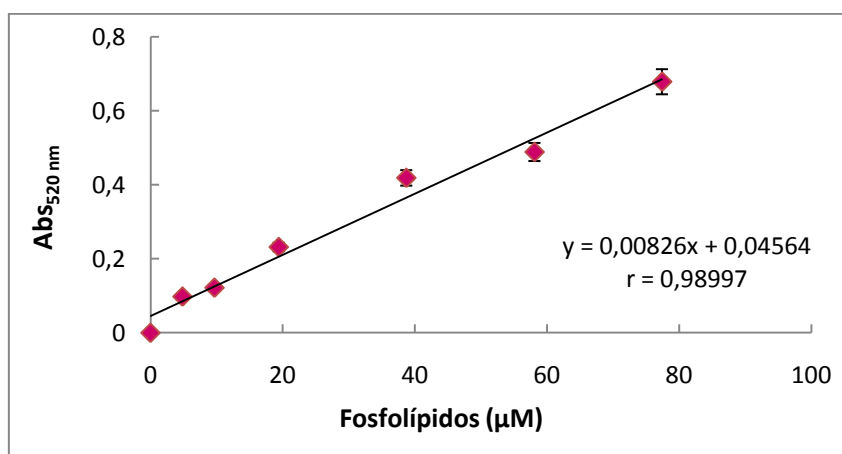


Figura A.3: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na quantificação de fosfolípidos, utilizando uma solução padrão de fosfolípidos (0 - 80 μM)

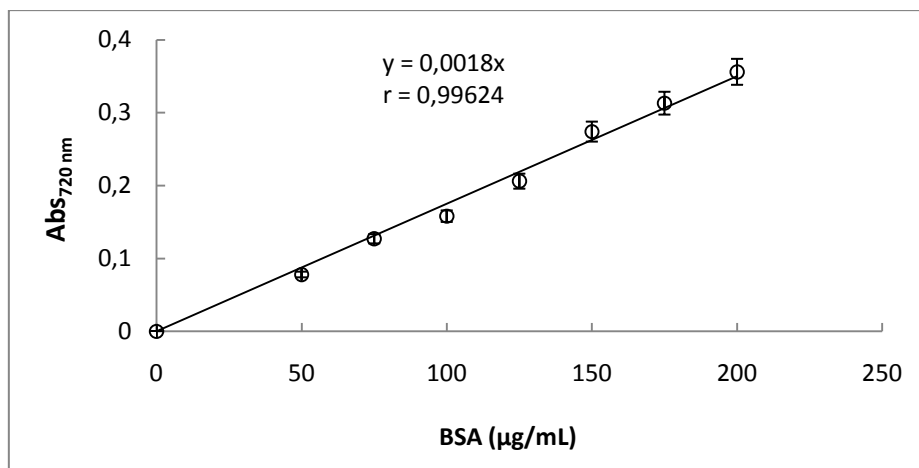


Figura A.4: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na determinação da proteína total, utilizando uma solução padrão de BSA (0 – 200 µg/mL).

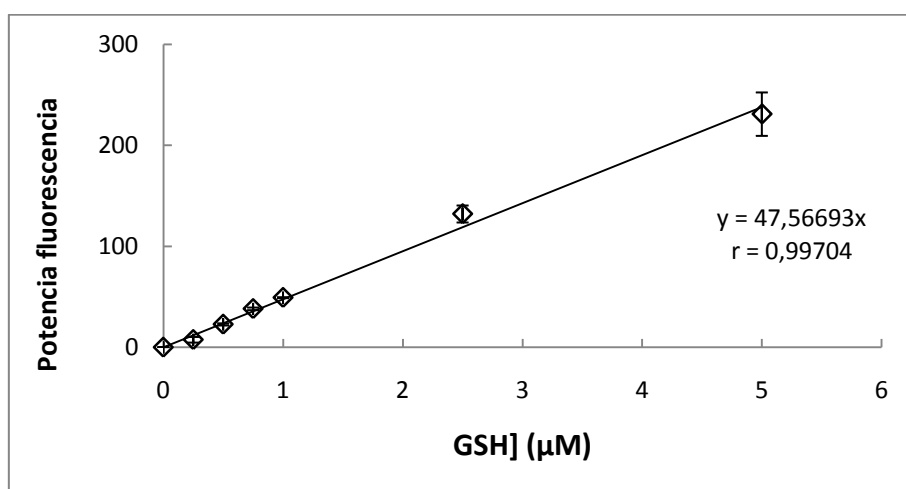


Figura A.5: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na determinação de GSH, utilizando uma solução padrão de GSH (0 - 5 µM)

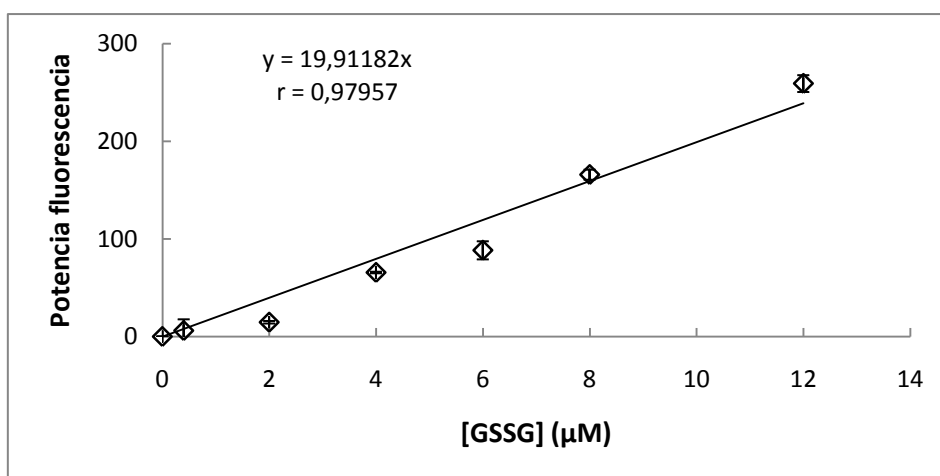


Figura A.6: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na determinação de GSSG, utilizando uma solução padrão de GSSG (0 - 12 µM)

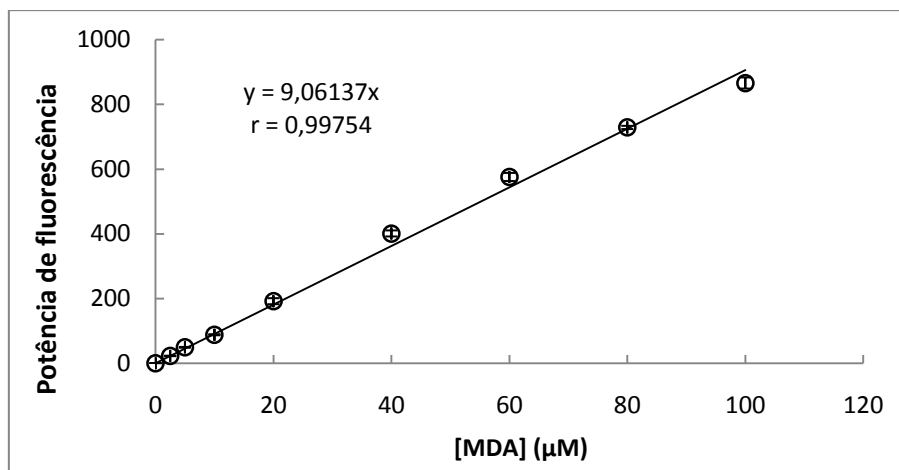


Figura A.7: Representação gráfica da curva de calibração utilizada na determinação de MDA, utilizando uma solução padrão de MDA (0 - 100 μM)

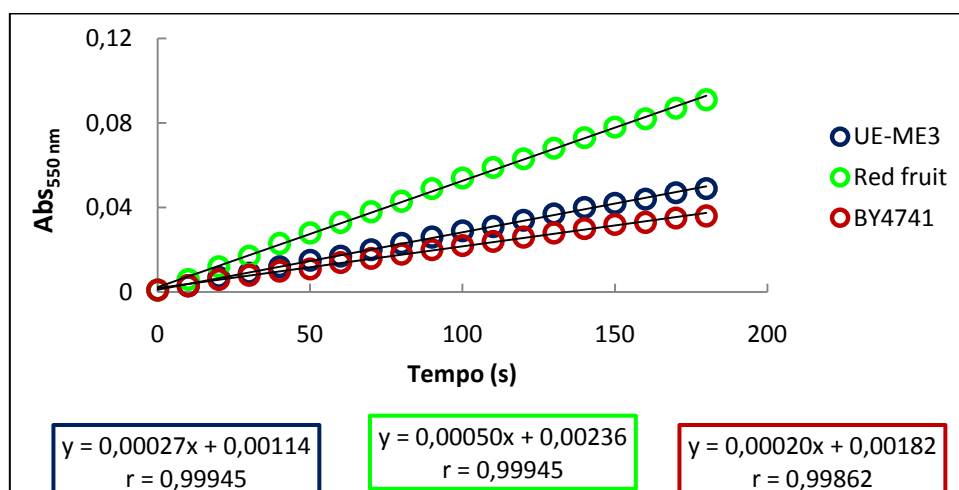


Figura A.8: Representação gráfica das curvas de reacção da NADH desidrogenase em meio YEPD de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

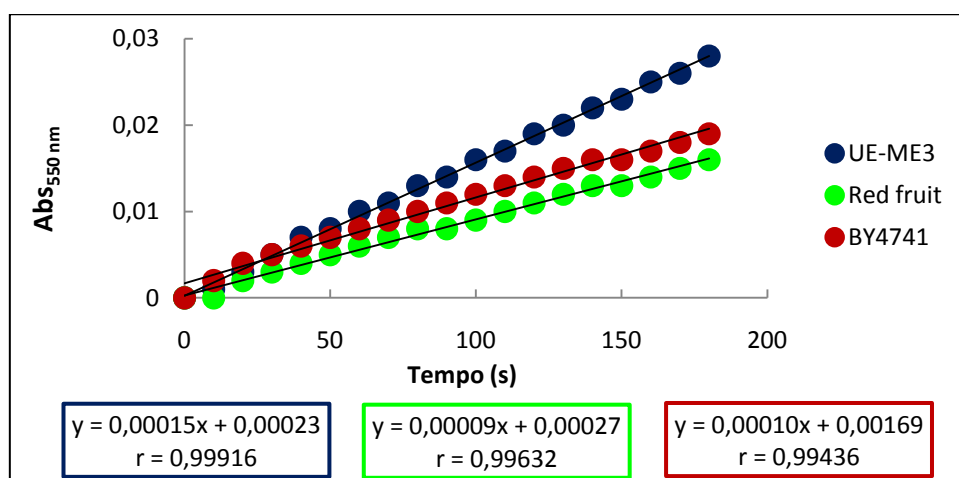


Figura A.9: Representação gráfica das curvas de reacção da NADH desidrogenase em meio YEPD-V de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

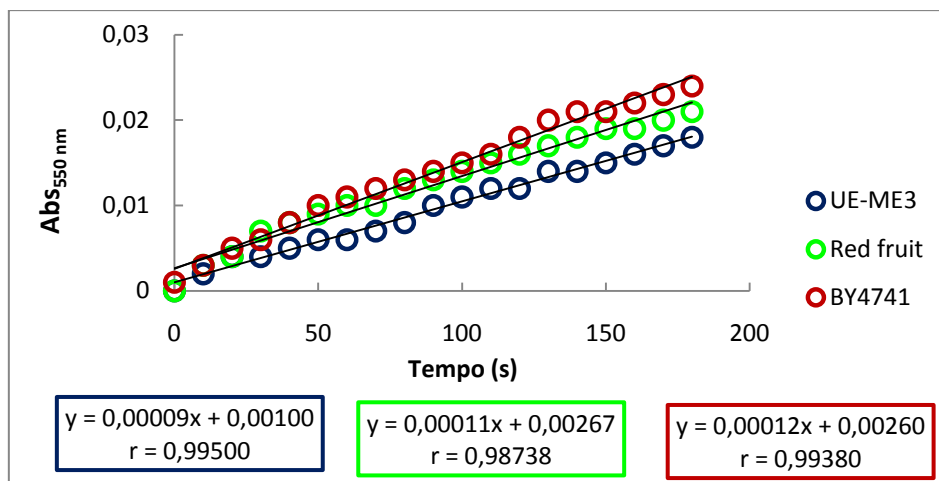


Figura A.10: Representação gráfica das curvas de reacção da NADPH desidrogenase em meio YEPD de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

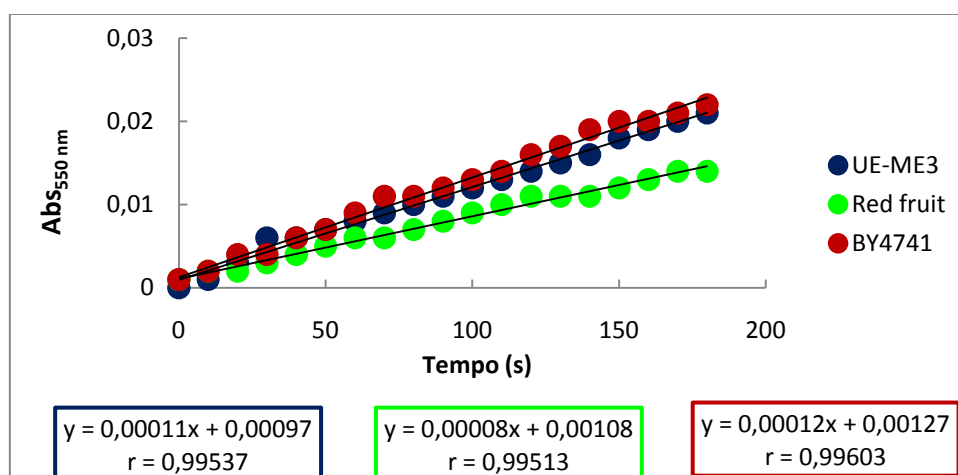


Figura A.11: Representação gráfica das curvas de reacção da NADPH desidrogenase em meio YEPD-V de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

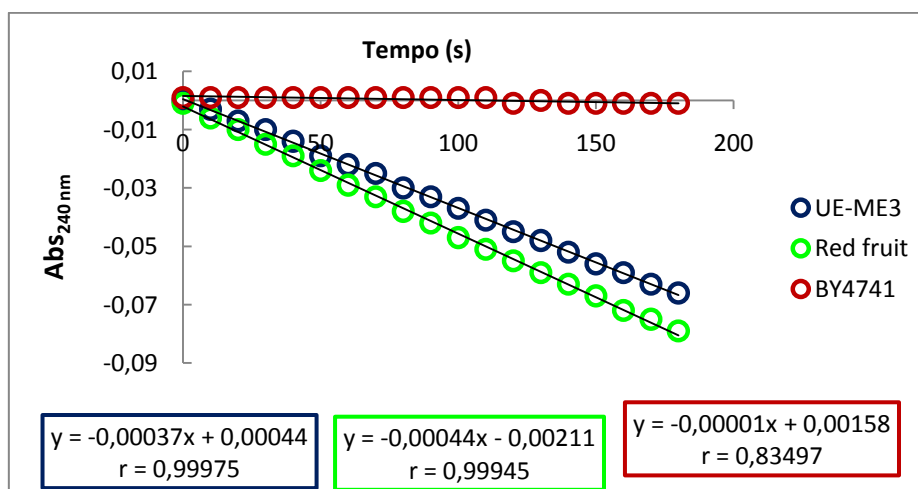


Figura A.12: Representação gráfica das curvas de reacção da Catalase T em meio YEPD de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

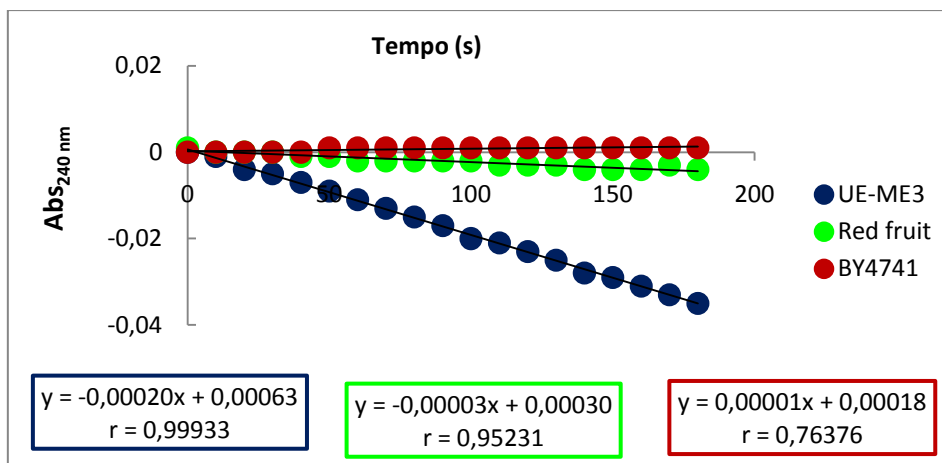


Figura A.13: Representação gráfica das curvas de reacção da Catalase T em meio YEPD-V de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

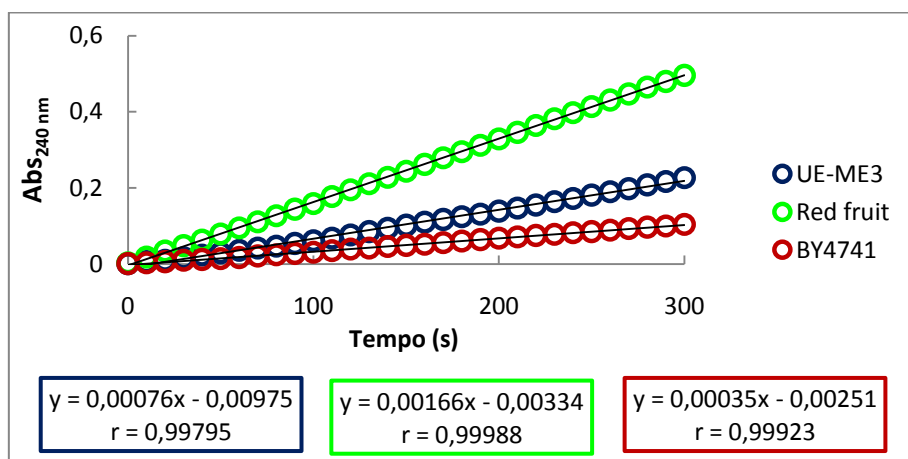


Figura A.14: Representação gráfica das curvas de reacção da Glucose-6-fosfato desidrogenase em meio YEPD de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

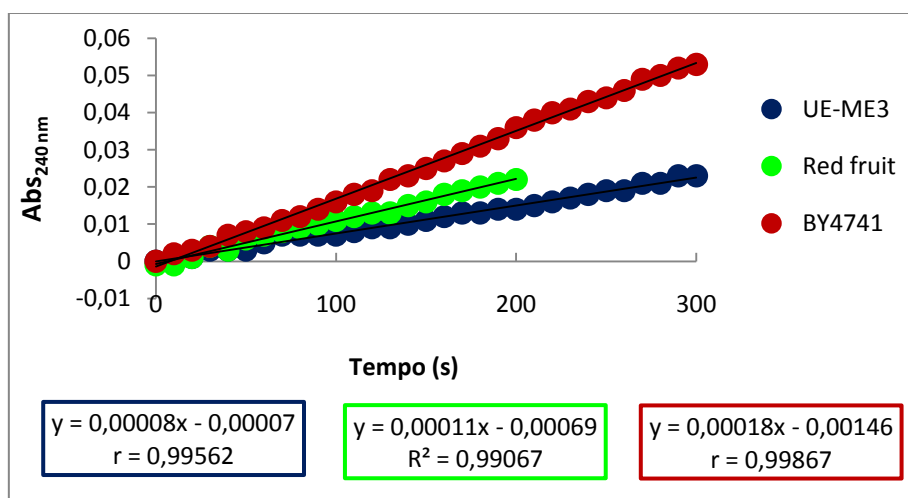


Figura A.15: Representação gráfica das curvas de reacção da Glucose-6-fosfato desidrogenase em meio YEPD-V de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

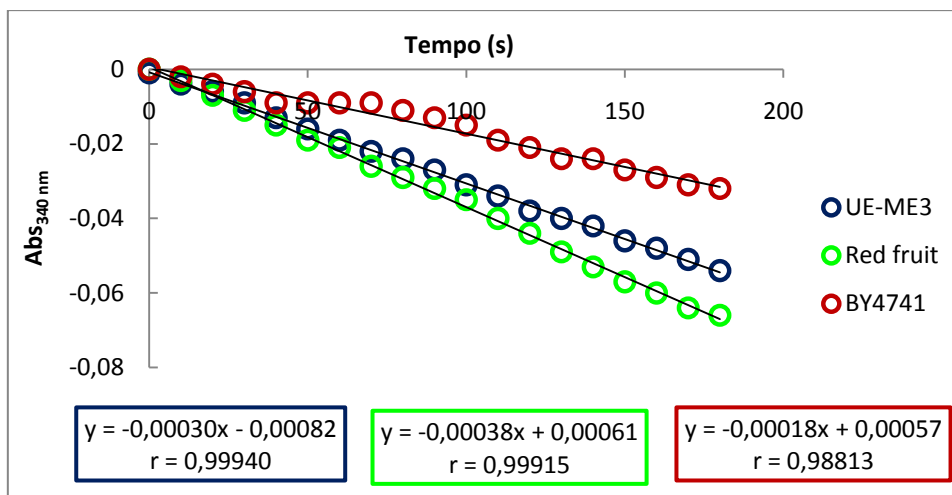


Figura A.16: Representação gráfica das curvas de reacção da Glutatio redutase em meio YEPD de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

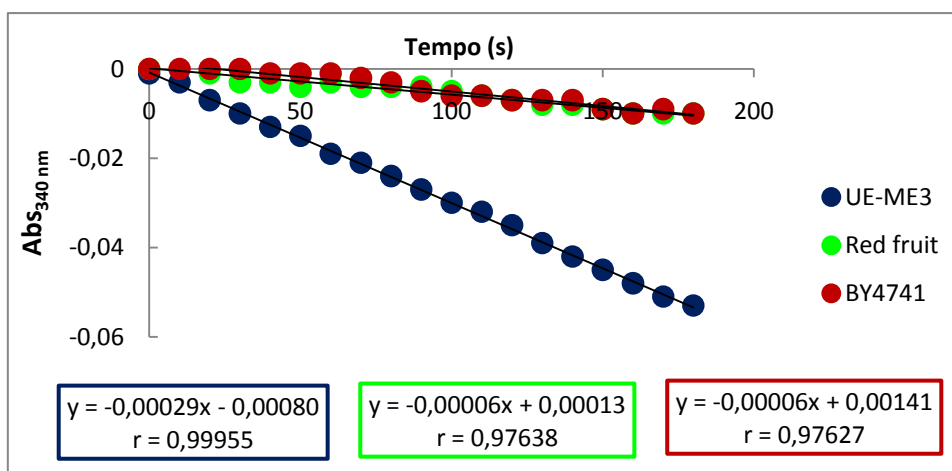


Figura A.17: Representação gráfica das curvas de reacção da Glutatio redutase em meio YEPD-V de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

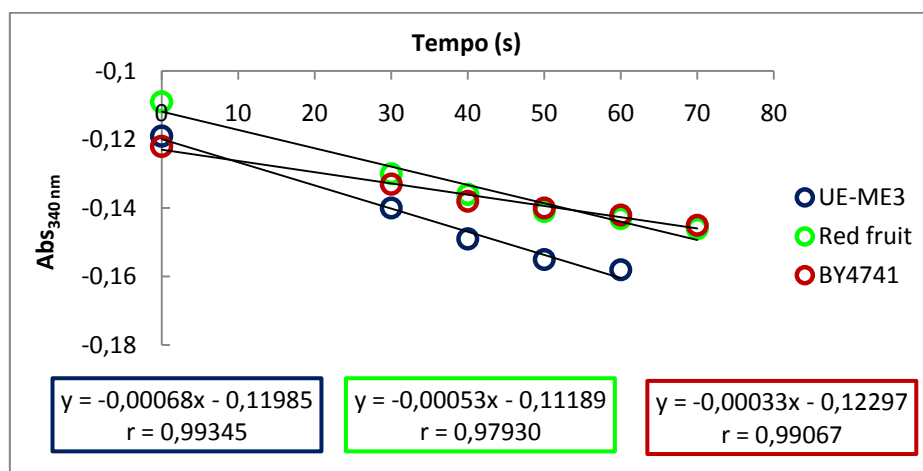


Figura A.18: Representação gráfica das curvas de reacção da Glutatio peroxidase em meio YEPD de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

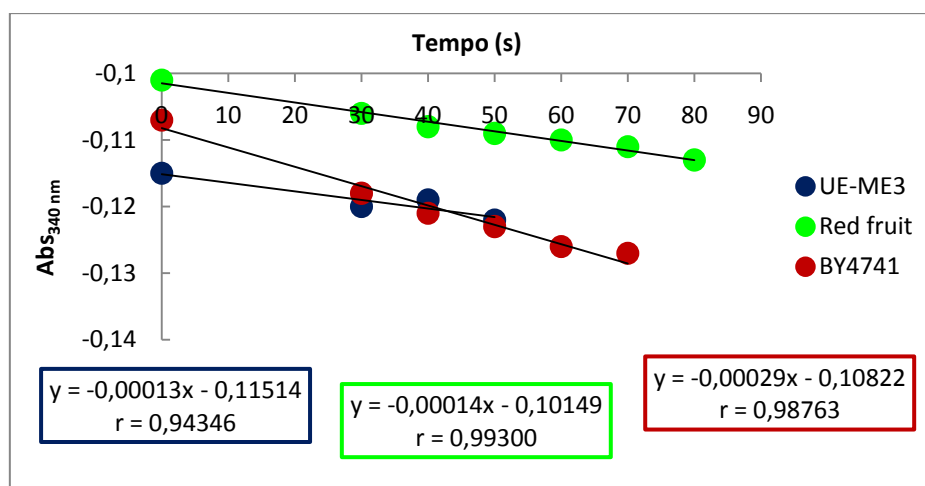


Figura A.19: Representação gráfica das curvas de reação da Glutatioxoperoxidase em meio YEPD-V de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME<sub>3</sub>, Red fruit e BY4741.

Tabela A.1: Resultados da análise de variância (modelo "ANOVA-ONE WAY")

Parâmetros	Origem da variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
Peso seco	Entre grupos	2709,169	5	541,834	2947,845	,000
	No interior dos grupos	4,411	24	,184		
	Total	2713,581	29			
Glutatioxoperoxidase redutase	Entre grupos	197,419	5	39,484	110,391	,000
	No interior dos grupos	8,584	24	,358		
	Total	206,003	29			
Glutatioxoperoxidase	Entre grupos	377674,052	5	75534,810	291,427	,000
	No interior dos grupos	6220,556	24	259,190		
	Total	383894,608	29			
Glucose-6-fosfato desidrogenase	Entre grupos	6757,396	5	1351,479	1165,946	,000
	No interior dos grupos	27,819	24	1,159		
	Total	6785,215	29			
Catalase T	Entre grupos	5667,136	5	1133,427	162,531	,000
	No interior dos grupos	167,366	24	6,974		
	Total	5834,502	29			
MDA	Entre grupos	2,204E7	5	4407363,025	813,872	,000
	No interior dos grupos	129967,312	24	5415,305		
	Total	2,217E7	29			

**Tabela A.2: Continuação dos resultados da análise de variância (modelo "ANOVA-ONE WAY")**

Parâmetros	Origem da variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
NADH desidrogenase	Entre grupos	96813,329	5	19362,666	628,526	,000
	No interior dos grupos	739,355	24	30,806		
	Total	97552,684	29			
GSH/GSSG	Entre grupos	3,883	5	,777	70897,384	,000
	No interior dos grupos	,000	24	,000		
	Total	3,883	29			
Ergosterol (fracção mitocondrial)	Entre grupos	253939,245	5	50787,849	690,820	,000
	No interior dos grupos	1764,436	24	73,518		
	Total	255703,681	29			
Triacilgliceróis (fracção mitocondrial)	Entre grupos	857819,601	5	171563,920	315,833	,000
	No interior dos grupos	13037,050	24	543,210		
	Total	870856,652	29			
Fosfolípidos (fracção mitocondrial)	Entre grupos	275959,742	5	55191,948	186,838	,000
	No interior dos grupos	7089,600	24	295,400		
	Total	283049,342	29			
NADPH (P450) desidrogenase	Entre grupos	4311,059	5	862,212	114,887	,000
	No interior dos grupos	180,117	24	7,505		
	Total	4491,176	29			
Ergosterol (fracção mitocrossomal)	Entre grupos	158907,575	5	31781,515	1019,276	,000
	No interior dos grupos	748,332	24	31,180		
	Total	159655,906	29			
Triacilgliceróis (fracção mitocrossomal)	Entre grupos	158697,043	5	31739,409	83,557	,000
	No interior dos grupos	9116,505	24	379,854		
	Total	167813,548	29			
Fosfolípidos (fracção mitocrossomal)	Entre grupos	418187,203	5	83637,441	173,876	,000
	No interior dos grupos	11544,428	24	481,018		
	Total	429731,631	29			



