

*Melhoramento genético de estirpes *Saccharomyces cerevisiae*
YAP1-GFP e MSN2-GFP para a determinação de sensibilidade a
drogas*

Rita Fernandes Pascoal

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia Aplicada

Tese orientada por: Prof.^a Doutora Lisete Celestina Perpétua Fernandes^{1, 2, 3}

Orientador interno: Prof. Doutor Américo Rodrigues^{3, 4}

¹ BioFIG, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

² Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa

³ Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras

⁴ Escola Superior de Turismo e Tecnologia do mar, Instituto Politécnico de Leiria

Título da dissertação: Melhoramento genético de estirpes *Saccharomyces cerevisiae* *YAPI-GFP* e *MSN2-GFP* para a determinação de sensibilidade a drogas

Copyright© Rita Fernandes Pascoal

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



O trabalho para esta dissertação foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia do Centro para a Biodiversidade, Genómica Integrativa e Funcional (BioFIG), situado na Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao Doutor Rogério Tenreiro pela oportunidade no momento certo e por me acolher afavelmente no Laboratório LMB-BioFIG, proporcionando um ambiente e condições de trabalho excepcionais, fundamentais à realização da dissertação desenvolvida.

Agradeço à Doutora Lisete Fernandes por ter sido uma orientadora incansável, por toda a paciência e conhecimento transmitido. Por todo o ensino, método e rigor que inculuiu desde o início, que sem dúvida enriqueceram o meu saber no âmbito da ciência. Com certeza que levo um exemplo para a minha vida profissional futura. É um orgulho ter feito parte do grupo de investigação *Yeast Stress* que me recebeu de braços abertos e me fez sentir parte de uma equipa.

Em especial quero agradecer à Ana Amorim que sempre me apoiou e aconselhou nos momentos mais difíceis. Sem dúvida um exemplo de força e dedicação a seguir. Muito obrigada por toda a ajuda, partilha e confiança no laboratório, pela compreensão e palavra certa na “hora H”. Mais que uma colega de trabalho cheia de energia, uma amiga do “norte”.

Agradeço também ao Doutor Américo Rodrigues pela disponibilidade e apoio desde o começo, pela preocupação e conselhos fundamentais para algumas decisões.

Não posso deixar de agradecer a toda a equipa do LMB-BioFIG que me acompanhou durante todo o ano e com quem partilhei não só o local de trabalho, como também os cafés e almoços diários que certamente deixarão saudades, o humor da segunda, as conversas “*geeks*” e divagações, momentos descontraídos e outros mais difíceis, enfim memórias que ficarão para mais tarde recordar. Obrigada caros colegas Ana Almeida, Tânia Ribeiro, Cláudia Luís e Luís Sobral, sem vocês não teria sido a mesma coisa.

E porque a vida tem mais piada graças aos amigos...um obrigada especial, que parece sempre não ser suficiente, a todos os que me acompanharam, “aturaram” e sempre me motivaram durante este percurso, aos amigos da Turma, aos amigos de casa, aos novos

amigos e aos de sempre! Obrigada Adriana Cabeçinhas, Joana Patriarca, Samantha Morais, Cláudia Loureiro, Nelson Alves, Ana Nóbrega, Vanda Gomes e todos aqueles que de uma forma ou outra estiveram presentes.

Por último, apesar de parecer não haver palavras certas, destaco a minha família que me apoiou incondicionalmente, sempre acreditou em mim e esteve do meu lado, a quem devo tudo aquilo que sou. Obrigada Rui e Raúl pelo carinho e força. Obrigada Mãe e Pai por todo o vosso esforço e dedicação, por todos os valores inculcados, pelo amor e amizade, pelos conselhos e paciência constante. Sem vocês este trabalho não tinha sido possível.

RESUMO

No âmbito da saúde e farmacologia a procura de compostos para a prevenção e tratamento de doenças é constante, tendo sido valorizada atualmente a medicina tradicional aliada à existência de diversos compostos naturais provenientes de plantas, fungos e bactérias com ação anti-inflamatória e antimicrobiana. Logo é valorizada a investigação e estudos específicos das propriedades terapêuticas de compostos, dos mecanismos de ação e compreensão dos seus efeitos, úteis ao avanço da medicina. Posto isto, aliada à relevância do stresse oxidativo, associado a danos oxidativos e envolvimento em várias doenças humanas e no processo de envelhecimento, surge a necessidade de construção de uma ferramenta que permita estudar o efeito de drogas ao nível do stresse oxidativo, de modo a avaliar o potencial terapêutico, clarificar a respetiva função e abranger a aplicação de compostos que têm sido cada vez mais valorizados. Assim, foi delineado como objetivo o melhoramento genético de estirpes *Saccharomyces cerevisiae*, de modo a promover a acumulação de drogas e, conseqüentemente promover as condições que despoletam a ação dos ativadores Yap1 e Msn2 ao nível do stresse oxidativo.

Neste contexto, foi otimizada uma metodologia para a construção de novas estirpes haploides de *S. cerevisiae* com seis cruzamentos distintos que combinam a deleção independente de três transportadores diferentes (*TxA*, *TyA* e *TzA*) e, em simultâneo, cada um dos ativadores Yap1 e Msn2 em fusão com a Gfp (*A-GFP*). Estas estirpes haploides foram selecionadas por análises fenotípicas, confirmadas ao nível do genótipo pretendido por PCR e ensaios de microscopia de fluorescência quando sujeitas previamente ao tratamento com H₂O₂, que não só confirmou o genótipo *A-GFP*, como também permitiu avaliar qualitativamente a sensibilidade das estirpes ao H₂O₂ pela observação da localização nuclear da Gfp. No sentido de obter uma ferramenta simples de fácil manipulação e baixo custo que facilite a exposição de compostos e permanência no interior das células, de modo a potenciar o seu efeito a baixas concentrações e permitir uma análise mais assertiva, criou-se uma ferramenta que permitirá a caracterização de propriedades e efeitos pró-oxidantes e/ou antioxidantes de drogas ao nível do stresse oxidativo em levedura.

Palavras-chave: *Screening* de drogas, stresse oxidativo, Yap1, Msn2.

ABSTRACT

In regards with health and pharmacological field compounds for disease prevention and treatment has been constantly searched. Nowadays the conventional medicine has given attention due to the diversity of natural compounds from plants, fungi and bacteria with anti-inflammatory and antimicrobial action. It is known that biotechnological research and specific studies about therapeutic properties of compounds, its mechanisms of action and its effects are useful for medicine improvement and knowledge. Nevertheless, oxidative stress relevance associate to oxidative damage and involvement in several human diseases and aging process came up with the requirement to construct a tool that allows the study of drugs effects relative to oxidative stress, in a way to evaluate the therapeutic potential, clarify its function and embrace the application of compounds with special interest.

Therefore, it was optimized a methodology to construct haploid *S. cerevisiae* strains with improved genetic background, in order to combine the deletion independent of three different transporters (*TxΔ*, *TyΔ* e *TzΔ*), with each activator Yap1 and Msn2 fused with fluorescent protein Gfp (*A-GFP*). These haploid strains were selected by phenotypically analyses, confirmed by PCR and fluorescence microscopy assays with previous H₂O₂ treatment, which confirmed the genotype of interest and permitted the qualitatively analysis of H₂O₂ sensibility by the observation of nuclear signal of Gfp. So, it was generated *S. cerevisiae* strains as a tool that can be used to characterize drugs properties and prooxidant and/or oxidant effect in yeast. In other words, a simple model, through easy manipulation and low cost to facilitate the intracellular permanence of compounds at low concentration, in order to maximize its effect and allow an assertive analysis.

Keywords: Drugs screening, oxidative stress, Yap1, Msn2.

ÍNDICE DE MATÉRIAS

1. Introdução	1
1.1 Estado da arte	1
1.2 Objetivo	2
2. Revisão da literatura	5
2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo	5
2.2. O stresse oxidativo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.3 O peróxido de hidrogénio como alavanca da expressão genética	7
2.4 O papel dos transportadores na destoxificação celular	8
2.5 Compostos naturais derivados de plantas como antioxidantes	9
3. Metodologia	13
3.1 Equipamento relevante de laboratório	13
3.2 Material biológico, meios de cultura e condições de crescimento	13
3.3 Construção de estirpes <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutantes	14
3.3.1 Cruzamento de haploides <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e seleção dos diploides obtidos	15
3.3.2 Confirmação preliminar dos diploides por microscopia de fluorescência	18
3.3.3 Esporulação dos diploides e seleção aleatória dos esporos	19
3.4 Seleção das estirpes <i>Saccharomyces cerevisiae</i> haploides	19
3.4.1 Seleção auxotrófica e por resistência à geneticina G418	20
3.4.2 Confirmação molecular das estirpes <i>GFP⁺</i> e <i>TA</i>	20
3.5 Caracterização do crescimento celular através de curvas de crescimento	21
3.6 Confirmação final do genótipo <i>GFP⁺</i> das estirpes haploides, determinação da sensibilidade ao H ₂ O ₂ por microscopia de fluorescência	22
4. Resultados e discussão	23
4.1 Construção de estirpes haploides mutantes <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
4.1.1 O cruzamento dos haploides, seleção e confirmação de diploides	23
4.1.2 A esporulação de diploides	28
4.2 Seleção fenotípica e confirmação molecular das estirpes haploides	29
4.3 Caracterização e análise comparativa do crescimento celular	35
4.4 Validação das estirpes haploides construídas e determinação da sensibilidade ao H ₂ O ₂ por microscopia de fluorescência	37

5. Conclusão	43
6. Referências bibliográficas	45
7. Anexos	49

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1** - Representação da regulação da localização intracelular do fator de transcrição Yap1 quando em condições celulares normais, sem stresse e em condições de stresse por ação do H₂O₂. Imagem adaptada a partir de [1].8
- Figura 2.2**– Estrutura química da coumarina e composto derivado 7-hidroxycoumarina (umbeliferona). Imagem adaptada a partir de [4].11
- Figura 3.1** – Esquema ilustrativo da metodologia usada, com imagem de *SGD wiki e Science aid webpage* adaptadas. A – Construção das estirpes de *S. cerevisiae* haploides no contexto do ciclo de vida da levedura (etapas: a₁, a₂ e a₃); B – Seleção e confirmação das estirpes haploides construídas (etapas: b₁ e b₂); C – Caracterização das estirpes e confirmação ao nível da sensibilidade ao H₂O₂ (etapas: c₁ e c₂).17
- Figura 4.1** – Placas SC-Lys-Met com diploides provenientes da conjugação das estirpes parentais em dois meios diferentes.24
- Figura 4.2** – Células dos diploides de meio sólido com adição de H₂O₂ em *live imaging*. Fotos adquiridas no microscópio de fluorescência invertido Axio vert.A1 Carl Zeiss em campo claro (CC) e tempo de exposição 10 ms; com o filtro para a Gfp (BP 475-495 nm e LP 515 nm) e tempo de exposição 2000 ms; ampliação total de 1000x.25
- Figura 4.3** – Células diploides em meio líquido com tratamento de H₂O₂ 10 minutos e fixação com formaldeído. Fotos adquiridas no microscópio de fluorescência invertido Olympus IX50 com o filtro para a Gfp e tempo de exposição 2500 ms; e com filtro para DIC e tempo de exposição 500 ms; ampliação total 1000x.27
- Figura 4.4** – Esquema das etapas da análise fenotípica e seleção dos candidatos haploides de acordo com o genótipo pretendido. O símbolo (X) significa não ocorrência de proliferação celular e o símbolo (√) significa a ocorrência de proliferação celular.30
- Figura 4.5** – Eletroforese em géis de agarose (1,5%) em TBE 0,5x com os resultados PCR. 1 - Confirmação do genótipo *A-GFP* para os haploides *TxA1 YAPI-GFP*; 2 - Confirmação do genótipo *TA* para os haploides *TxA1 YAPI-GFP*. L – Marcador *GeneRulerTM* 1 Kb ADN (0,1 µg/µL). *Primers* usados (Tabela 3.3): A₁, A₂, C₁, C₂.33
- Figura 4.6** - Eletroforese em géis de agarose (1,5%) em TBE 0,5x com os resultados PCR. **1,3 e 5** - Confirmação do genótipo *A-GFP* para os haploides *TxA1 MSN2-GFP*, *TyΔ YAPI-GFP* e *TyΔ MSN2-GFP*, respetivamente. **2,4 e 6** - Confirmação do genótipo *TA* para os haploides *TxA1 MSN2-GFP*, *TyΔ YAPI-GFP* e *TyΔ MSN2-GFP*, respetivamente. L – Marcador *GeneRulerTM* 1 Kb ADN (0,1 µg/µL). *Primers* usados (Tabela 3.3): A₁, A₂, B₁, B₂, C₁, C₂, D₁, D₂.34

Figura 4.7 – Eletroforese em géis de agarose (1,5%) em TBE 0,5x com os resultados PCR. 1 e 2 - Confirmação do genótipo *A-GFP* para os haploides *TzΔ YAPI-GFP* e *TzΔ MSN2-GFP*, respetivamente. 3 - Confirmação do genótipo *TA* para os haploides *TzΔ YAPI-GFP* e *TzΔ MSN2-GFP*. L – Marcador *GeneRuler™* 1 Kb ADN (0,1 µg/µL). *Primers* usados (Tabela 3.3): A₁, A₂, B₁, B₂, E₁, E₂.....35

Figura 4.8 – Gráficos da DO a 600 nm em função do tempo em horas para cada um dos três haploides de cada cruzamento *TA A-GFP*. A DO foi medida periodicamente durante 24 horas a partir de suspensões celulares em meio SC líquido completo.36

Figura 4.9 – Gráficos de barras da média da percentagem (%) de células com localização nuclear, sem tratamento e com tratamento com 0,25 mM de H₂O₂. A₁, B₁ e C₁ representam os haploides (*TA MSN2-GFP*) respetivamente. A₂, B₂ e C₂ representam cada dos haploides (*TA YAPI-GFP*) respetivamente. Resultados provenientes da 2ª aquisição de imagens por microscopia de fluorescência. As barras erros apresentam o máximo e o mínimo.38

Figura 4.10 – Imagens dos haploides de *S. cerevisiae* adquiridas no microscópio de fluorescência Leica DM 5500 B com o filtro DIC com 250 ms de exposição, filtro para a Gfp com 2500 ms de exposição e filtro para o DAPI com 600 ms de exposição. A - Haploides com genótipo *TxΔ YAPI-GFP*; B – Haploides com genótipo *TxΔ MSN2-GFP*.40

Figura 4.11 - Imagens dos haploides de *S. cerevisiae* adquiridas no microscópio de fluorescência Leica DM 5500 B com o filtro DIC com 250 ms de exposição, filtro para a Gfp com 2500 ms de exposição e filtro para o DAPI com 600 ms de exposição. A - Haploides com genótipo *TyΔ YAPI-GFP*; B – Haploides com genótipo *TyΔ MSN2-GFP*.41

Figura 4.12 – Imagens dos haploides de *S. cerevisiae* adquiridas no microscópio de fluorescência Leica DM 5500 B com o filtro DIC com 250 ms de exposição, filtro para a Gfp com 2500 ms de exposição e filtro para o DAPI com 600 ms de exposição. A - Haploides com genótipo *TzΔ YAPI-GFP*; B – Haploides com genótipo *TzΔ MSN2-GFP*. 42

Figura 7.1 - Gráficos de barras da média da percentagem (%) de células com localização nuclear, sem tratamento e com tratamento com 0,25 mM de H₂O₂. A₁, B₁ e C₁ representam os haploides (*TA MSN2-GFP*) respetivamente. A₂, B₂ e C₂ representam cada dos haploides (*TA YAPI-GFP*) respetivamente. Resultados provenientes da 1ª aquisição de imagens por microscopia de fluorescência. As barras erros apresentam o máximo e o mínimo.56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Estirpes haploides parentais de <i>S. cerevisiae</i>	14
Tabela 3.2 – Apresentação dos seis cruzamentos e respetivo genótipo para os diploides. .	15
Tabela 3.3 – <i>Primers</i> selecionados para as reações de PCR e respetivo propósito.	21
Tabela 3.4 - Filtros do microscópio Leica DM 5500 B usados, respetivo propósito de utilização, comprimentos de ondas (excitação e emissão) e tempo de exposição aplicado.	22
Tabela 4.1 – Resultados da triagem dos candidatos haploides, provenientes da esporulação de diploides, selecionados fenotipicamente, genotipicamente e os haploides escolhidos para caracterização e análise seguintes.	32
Tabela 7.1 - Meios usados com composição detalhada.	49
Tabela 7.2 – Soluções, respetiva composição e preparação.	50
Tabela 7.3 – Estirpes diploides construídas por cruzamento de estirpes haploides parentais, respetivos nomes e genótipo.....	51
Tabela 7.4 - Estirpes haploides construídas por esporulação das estirpes diploides, respetivos nomes, diploide original, número da esporulação e genótipo.....	53
Tabela 7.5 – Exemplo das combinações de genótipo possíveis para os esporos obtidos na esporulação para um dos cruzamentos (<i>TxA1 YAPI-GFP</i>). O sombreado indica aqueles que se pretende selecionar.	55

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

Símbolos:

Δ	Deleção de um gene
::	Disrupção de um gene
$\Delta::$	Substituição de um gene por um outro
$T\Delta$	Deleção de um gene que codifica um transportador de <i>S.cerevisiae</i>
<i>A-Gfp</i>	Gene que codifica o fator de transcrição (Yap1 ou Msn2) em fusão com a ORF que codifica a Gfp

Abreviaturas e siglas:

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ALDp	Transportador ABC peroxissomal <i>half-size</i>
cAMP	Monofosfato de adenosine cíclica
CC	Campo claro
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CRD	Domínio rico em cisteína
Crm1	<i>Chromosome Region Maintenance</i> - Proteína recetora para sinais de exportação nuclear ricos em leucina
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI	Dihidrocloreto
DIC	Contraste de Interferência Diferencial
DO	Densidade ótica
ERO	Espécies reativas de oxigénio
FITC	Filtro para isocianato de fluoresceína
GFP	Proteína verde fluorescente
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
Hsf1	Fator de transcrição <i>trimeric heat shock</i>
MAT a	Locus tipo- <i>mating</i> que expressa <i>a</i> como o tipo- <i>mating</i> da célula haploide
MAT α	Locus tipo- <i>mating</i> que expressa α como o tipo- <i>mating</i> da célula haploide
MDR	Multiresistência
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
Msn2	<i>Multicopy Suppressor of SNF1 mutation</i> - fator de transcrição <i>Zinc finger</i>

NES	Sinal de exportação nuclear
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	Proteína Cinase A
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PDR	Resistência pleiotrópica a drogas
SC	<i>Synthetic complete</i>
Skn7	Supressor de <i>Kre Null</i>
STRE	<i>Stress Response Element</i>
TBE	Solução tampão <u>T</u> ris/ <u>B</u> orato/ <u>E</u> DTA
TPA	Trifosfato de adenosina
TRX1/2	Tioredoxinas 1 e 2
Yap1	<i>Yeast AP-1</i> - fator de transcrição basic leucine-zipper
YEF3	<i>Yeast elongation factor</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base without amino acids</i>
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estado da arte

No ramo da biotecnologia as leveduras são amplamente utilizadas a nível industrial, sendo da maior importância que estes microrganismos desempenhem um metabolismo eficaz, sejam resistentes e com capacidade de adaptação a condições de stresse que possam alterar a sua capacidade fermentativa. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) é uma espécie já comumente usada em estudos moleculares envolvidos na resposta ao stresse [1]. Dos diferentes tipos de stresse destaca-se o stresse oxidativo associado a alguns problemas significativos no setor industrial, nomeadamente a exposição ao stresse das próprias leveduras usadas na produção de pão e cerveja, durante os processos de congelamento e secagem, e a oxidação de óleos e gorduras que alteram as propriedades dos produtos alimentares. No âmbito da saúde, o stresse oxidativo é relevante no que diz respeito ao dano oxidativo consequente, envolvido em várias doenças humanas e no processo de envelhecimento [2].

Neste contexto, a procura de compostos para a prevenção e tratamento de doenças é tão antiga quanto a espécie humana, existindo diversos compostos naturais provenientes de plantas, frutos, fungos e bactérias com ação anti-inflamatória e antimicrobiana (antibacteriana, antimicótica). Atualmente a valorização da medicina tradicional, aliada ao interesse e necessidades farmacêuticas pelas propriedades terapêuticas destes compostos suscitam à investigação biotecnológica e estudos específicos, relativamente aos mecanismos de ação e compreensão dos seus efeitos, úteis ao avanço da medicina [3, 4]. Desta forma, os compostos terapêuticos naturais têm sido valorizados relativamente aos compostos sintéticos, devido à sua diversidade e origem, cotando-os como mais acessíveis e seguros. Contudo, estes também se caracterizam pela sua fraca solubilidade e estabilidade química, que remete para uma maior tendência à degradação e oxidação. Consequentemente a baixa disponibilidade, a distribuição limitada e difícil alcance às moléculas alvo são desvantagens deste tipo de compostos. Na área de pesquisa e desenvolvimento de novas drogas, o número de compostos insolúveis têm aumentado consideravelmente, segundo a literatura 70% destas drogas são pouco solúveis em água [5]. Esta limitação na solubilidade ou a propensão à precipitação destas drogas em

determinados meios, pode suscitar a análises incorretas e caracterização inválida das respetivas propriedades biológicas. Por exemplo, em estudos de toxicidade é necessária uma elevada exposição dos compostos na células alvo, devido ao facto destes apresentarem fraca solubilidade, tornando problemático atingir um equilíbrio entre a concentração e o tempo de exposição, que permita não só o estudo dos efeitos terapêuticos destas drogas, mas também mantenha a viabilidade celular para que os resultados sejam válidos e fiáveis. Na área da farmacêutica, para além da questão da solubilidade, a permeabilidade, taxa de dissolução, o metabolismo e a suscetibilidade das drogas aos mecanismos de efluxo, relacionados com a disponibilidade destes compostos nos organismos são alvo de estudo corrente [6].

Neste sentido, estudos e trabalho de investigação anterior em *S. cerevisiae* [7], com o intuito de avaliar o potencial antifúngico e identificar possíveis mecanismos de ação de xenobióticos como a coumarina, revelaram os ativadores Yap1 e Msn2 ferramentas funcionais para o mapeamento do mecanismo de ação das coumarinas ao nível do stresse oxidativo, apontaram para alguns genes relevantes ao processo de destoxificação destes compostos em levedura e suscitaram a problemática da solubilidade deste tipo de compostos [7]. Posto isto, surge a necessidade de colmatar esta limitação continuando o trabalho já iniciado, no sentido de criar uma ferramenta única, de fácil manipulação e baixo custo que facilite a exposição destas drogas e permanência no interior das células, de modo a potenciar o seu efeito mesmo a baixas concentrações e permitir uma análise mais assertiva.

1.2 Objetivo

O objetivo geral desta dissertação consiste no melhoramento genético de estripes *S. cerevisiae*, de modo a promover a acumulação de drogas e, consequentemente promover as condições que despoletam a ação dos ativadores supracitados (Yap1 e Msn2), criando novas ferramentas que permitam a caracterização das propriedades e efeitos pró-oxidantes e/ou antioxidantes de drogas em levedura. Idealmente, este trabalho permitirá numa fase posterior avaliar também o papel e a diferença entre os vários transportadores testados no processo de destoxificação, bem como abranger este tipo de abordagem e construção genética, por exemplo, a outros fatores de ativação essenciais a outros tipos de stresse.

Pretende-se especificamente a:

- Construção de novas estirpes mutantes de *S. cerevisiae* por cruzamento de estirpes haploides com genótipo de interesse, e esporulação dos diploides resultantes;
- Seleção e caracterização das estirpes ao nível do fenótipo e do genótipo;
- Análise comparativa do crescimento celular das estirpes selecionadas;
- Validação das estirpes construídas como ferramenta de estudo do mecanismo de ação e efeitos de drogas que geram condições de stresse oxidativo, por microscopia de fluorescência.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Todos os organismos vivos estão sujeitos às constantes alterações do ambiente em que se inserem, podendo afetar a sua atividade metabólica, a sua proliferação e viabilidade. Contudo, as células possuem a capacidade de avaliar e adaptar às diversas condições externas, por vezes menos favoráveis, desenvolvendo a resposta celular adequada. A maioria destas respostas envolve alterações na expressão genética e atividade enzimática, através de vias de sinalização e transdução do sinal da superfície ou interior da célula até ao núcleo, resultando no controlo quer transcricional, quer pós-traducional e translocação de proteínas e outros solutos [8]. A resposta a condições de stresse, nomeadamente stresse térmico, osmótico, etanólico e oxidativo envolve também a reparação de danos ao nível macromolecular, criando um sistema de defesa e garantindo a própria sobrevivência às adversidades externas [9].

2.1 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

A levedura *S. cerevisiae* é um organismo unicelular eucariota, de interesse industrial e biotecnológico, vastamente utilizada como modelo de estudo e investigação molecular de sistemas biológicos. Esta espécie, cujo genoma foi totalmente sequenciado em 1996 [10], revela-se útil para a compreensão do ADN humano e de processos conservados entre leveduras e eucariotas superiores [11], dada a fração significativa de genes da levedura ortólogos de genes humanos que codificam proteínas similares com interesse funcional e impacto genético, nomeadamente na relevância em certas patologias [12]. Trata-se de um organismo bastante bem caracterizado ao nível do seu genoma, cujas sequências de genes e de proteínas se encontram em bases de dados públicas e de fácil acesso. Além disso, exhibe também como vantagens o curto ciclo de vida; o baixo custo de manutenção laboratorial; a fácil manipulação genética que viabiliza a deleção e inserção de genes no genoma, permitindo o estudo específico de determinado gene ou proteína [13]. Este microrganismo apresenta-se no estado diploide como haploide, cujo ciclo de vida admite a divisão mitótica, a recombinação homóloga e o cruzamento entre estirpes distintas, úteis em manipulação genética e *screenings* [14].

Em suma, esta espécie modelo destaca-se como ferramenta ideal para o estudo e análise de funções fisiológicas e dos mecanismos moleculares associados à resposta ao stresse oxidativo em eucariotas superiores, na medida que torna possível a criação de um modelo de caracterização relativamente simples e económico que ao mesmo tempo, torna possível a aplicação futura e válida em modelos mais complexos [11, 15-17].

2.2. O stresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae*

O crescimento em condições aeróbias acarreta a produção e neutralização constante de espécies reativas de oxigénio (ERO), provenientes do seu metabolismo celular como a respiração mitocondrial e reações catalisadas por oxidases, ou da exposição a determinados agentes oxidantes externos, de modo a manter um equilíbrio não tóxico para as células [18]. Esta exposição natural a ERO deve-se à redução do oxigénio molecular essencial à geração de trifosfato de adenosina (TPA), fornecido pela oxidação de moléculas orgânicas que também funcionam como fonte de carbono e necessário a todos os processos celulares [19].

O equilíbrio das ERO, nomeadamente iões superóxido (O_2^-), radicais livres hidroxilo (OH^\bullet) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é preservado em condições normais pelos microrganismos, devido às suas defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas [20], que neutralizam as ERO e reparam danos moleculares. Quando as ERO produzidas superam a capacidade do sistema de defesa antioxidante, as células assumem um estado de stresse oxidativo propício a danos celulares ao nível dos ácidos nucleicos, proteínas e lípidos [21], resultando na modificação danosa do ADN, na oxidação proteica e peroxidação lipídica, podendo levar a certas desordens, como por exemplo cancro e doenças cardiovasculares [2]. Todavia, o aumento de ERO pode-se verificar por diversas razões, tais como, a transição do crescimento anaeróbio para aeróbio, o aumento da atividade do processo de respiração mitocondrial e a exposição a agentes oxidantes externos, como xenobióticos. Nestas condições, são induzidos mecanismos de resposta distintos e complementares. Em primeiro lugar, após a deteção do sinal de stresse, é despoletado a ativação pós-traducional de defesas já existentes, protegendo as células no imediato para níveis subletais e preparando a resposta por vias de transdução do sinal, através da síntese de novas proteínas e defesas antioxidantes que conferem às células maior

resistência a níveis superiores que poderiam ser letais. Este mecanismo de adaptação é regulado por diferentes fatores de transcrição como resposta a condições de stresse oxidativo, alterando a expressão de determinados genes responsáveis por respostas gerais e específicas, que facultam às células maior tolerância ao stresse [1].

2.3 O peróxido de hidrogénio como alavanca da expressão genética

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é amplamente usado como oxidante modelo em estudos de stresse oxidativo [2], sendo fácil de usar dada a sua relativa estabilidade química e solubilidade em água [2]. Este composto é um subproduto da respiração aeróbia, também formado após exposição das células a diversos fatores ambientais e biológicos, capaz de desencadear condições de stresse oxidativo, provocando danos celulares, tendo um papel preponderante na sinalização e regulação de processos biológicos [22].

Está descrito que quatro fatores de transcrição desempenham uma função importante na ativação da expressão de genes em resposta ao H_2O_2 , tais como, Yap1, Skn7, Hsf1 e Msn2/4 [23]. A proteína *basic leucine-zipper bZip* (Yap1), cuja atividade é regulada pelo nível de exportação nuclear, é essencial na regulação da transcrição de genes em resposta ao stresse oxidativo induzido por metais pesados e outros agentes citotóxicos [18]. Esta proteína contém dois domínios ricos em cisteína localizados nas terminações N- e C- (CRD). A extremidade C-CRD contém o sinal de exportação nuclear (NES) rico em leucina [24]. Em condições normais, Yap1 encontra-se maioritariamente no citoplasma, devido ao transporte do núcleo mediado pela exportina Crm1. Porém, em condições de stresse oxidativo esta exportação é inibida, potenciando a acumulação nuclear deste fator de transcrição representada na Figura 2.1. Tal acontece devido às alterações estruturais reguladas pelas reações redox, isto é, a formação de ligações dissulfeto entre cisteínas das terminações CRD, que provocam a disrupção do complexo Yap1 com Crm1 [25]. Desta forma, a proteína Yap1 permanece no núcleo das células para ativar a transcrição de genes em resposta ao stresse oxidativo.

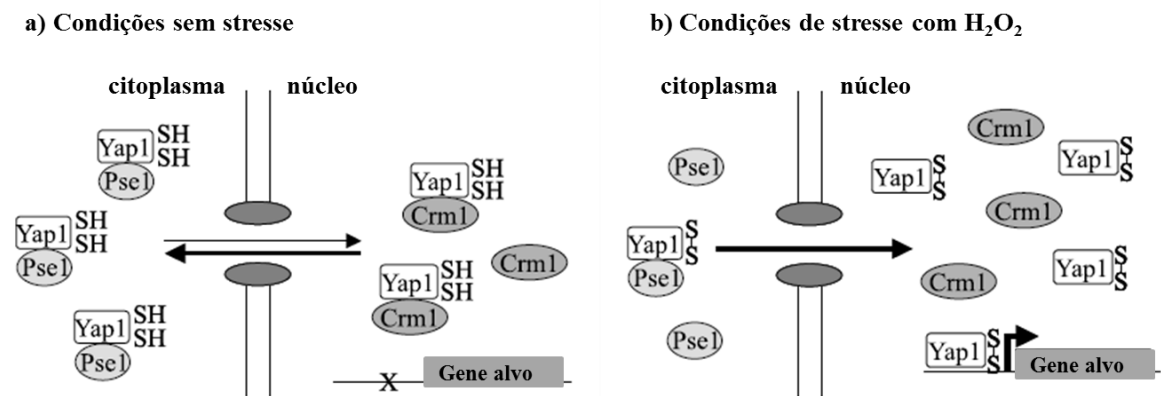


Figura 2.1 - Representação da regulação da localização intracelular do fator de transcrição Yap1 quando em condições celulares normais, sem stresse e em condições de stresse por ação do H₂O₂. Imagem adaptada a partir de [1].

Enquanto o Yap1 regula respostas específicas a condições de stresse oxidativo, o fator de transcrição Msn2 controla respostas ao stresse no geral, nomeadamente ao stresse osmótico ou térmico. Em condições de stresse, a diminuição dos níveis de cAMP e da atividade da proteína Cinase A (PKA), desencadeia o transporte da proteína *Zinc finger Cys₂His₂* (Msn2) do citoplasma para o núcleo, onde se liga à sequência CCCCT *Stress Response Element* (STRE) presente no promotor de determinados genes, envolvidos na resposta ao stresse, induzindo a respetiva transcrição [26]. Segundo Wolfram Goner [27] a presença das tioredoxinas (TRX1/2) é necessária para o H₂O₂ desencadear a localização nuclear do Msn2, estando descrito que esta localização é de 21% em resposta a stresse oxidativo e cerca de 100% quando sujeito ao stresse osmótico.

2.4 O papel dos transportadores na destoxificação celular

As células de levedura possuem várias estratégias para contrabalançar o stresse oxidativo, incluindo a destoxificação de oxidantes [15]. Existem transportadores em *S. cerevisiae* importantes na obtenção de nutrientes, no controlo do volume celular e deteção de compostos extra celulares, particularmente na resistência a drogas e no efluxo de metabolitos indesejáveis [28]. O sistema de destoxificação celular deve-se aos transportadores de efluxo situados em membranas celulares e aos fatores de transcrição que ativam e regulam a transcrição dos genes dessas mesmas proteínas membranares.

Em diferentes organismos desde fungos, bactérias a animais, o mecanismo de proteção a substâncias tóxicas endógenas e exógenas é mediado pelo efluxo destes compostos. Destacam-se as duas maiores famílias de transportadores em levedura: a família *ATP-binding cassette* (ABC) e a família *major facilitator superfamily* (MFS) [29]. Enquanto os transportadores ABC são capazes de hidrolisar TPA, usando a energia para transporte através das membranas contra o gradiente de eletroquímico, os transportadores MFS não hidrolisam TPA. Estes últimos são classificados como sistema secundário de transporte ativo, cujo transporte deve-se ao potencial membranar e gradiente eletroquímico de prótons [30, 31]. De acordo com a literatura, as proteínas ABC realizam não só simples funções de transporte membranar, como também desempenham um papel preponderante na regulação de vários processos celulares, tais como na regulação da função mitocondrial, na destoxificação vacuolar, na resistência pleiotrópica a drogas e na adaptação ao stresse. Os genes da família ABC em *S. cerevisiae* são regulados por fatores de transcrição da rede de resistência pleiotrópica a drogas (PDR) e classificam-se em cinco subfamílias: PDR, CFTR, MDR, ALDp e YEF3/RL1 [32], localizando-se na membrana plasmática, vacuolar, mitocondrial ou peroxissomal [33]. As proteínas ABC e MFS têm extrema relevância na resistência a várias drogas como antimicóticos. Podem ser selecionados fenótipos de resistência, baseados na sobre expressão destes transportadores quando expostos a uma droga. Conseqüentemente, este fenómeno de resistência a antimicóticos, associado aos transportadores, permite perceber a função e relevância destes quando sujeitos a drogas, e posteriormente contribuir para o melhoramento da eficácia do tratamento de doenças humanas causadas por microrganismos patogénicos, como por exemplo a *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* [34].

2.5 Compostos naturais derivados de plantas como antioxidantes

No âmbito do fenómeno de stresse oxidativo, dos danos associados e da relação com várias patologias, é crescente o interesse na procura de antioxidantes eficazes nesta resposta. Há vários compostos naturais com propriedades antioxidantes, capazes de reduzir os efeitos nefastos provocados pelas ERO através da captura e inativação dessas substâncias reativas [35]. Está descrito que antioxidante é qualquer substância que retarda, previne e remove danos oxidativos das moléculas alvo [36]. Estes antioxidantes podem atuar como inibidores da oxidação de radicais livres, como supressores de oxigénio, como agentes

redutores ao converter peróxidos em compostos estáveis, como agentes quelantes de metais pró-oxidantes e como inibidores de enzimas oxidantes [37].

Apesar da eficácia do sistema antioxidante humano endógeno, este depende também de antioxidantes exógenos naturais ou sintéticos presentes por exemplo na dieta alimentar, de modo a manter a concentração de ERO baixa [38]. Nesta sequência os antioxidantes exógenos de ocorrência natural representam um benefício tanto na área alimentar, como na área da farmacologia, respeitante à proteção a danos oxidativos. Nesta última, a procura de extratos de plantas e dos seus metabolitos secundários com ação sobre ERO e outros agentes oxidantes, tem adquirido especial protagonismo no sentido de efeitos preventivos ou corretivos de certas patologias associadas ao stresse oxidativo [39]. De acordo com a literatura estes compostos bioativos são classificados como fitoquímicos e podem advir de plantas, sementes, cereais, frutos, vegetais, raízes e especiarias como por exemplo o chá verde e a canela. Destacam-se os carotenóides, os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, coumarinas), os compostos azotados e compostos organossulfurados [40].

Os compostos fenólicos para além de serem dos mais estudados revelam atividade biológica benéfica para a saúde humana, dado o potencial antioxidante [35], a baixa toxicidade em mamíferos [41] e devido às suas características bioquímicas [4], porém está descrito que podem atuar como pró-oxidantes em sistemas que contenham metais redox ativos [37]. Segundo a literatura, pró-oxidantes são como químicos indutores de stresse oxidativo, através da formação de ERO ou da inibição dos sistemas antioxidantes. Curiosamente diversos antioxidantes podem ter comportamento pró-oxidante dependendo da sua própria concentração por autooxidação [37, 42]. Portanto, o comportamento e efeito destas substâncias está estreitamente relacionado com a sua concentração, podendo assim variar de uma ação benéfica para uma outra prejudicial [43]. Neste contexto, a dose administrada, a disponibilidade do composto, isto é, a fração da droga administrada que atinge o alvo e a compreensão do destino das moléculas desde a absorção até à expulsão, são questões pertinentes no âmbito do estudo da farmacocinética e dos efeitos terapêuticos destes compostos naturais. Um dos exemplos destes compostos são as coumarinas, metabolitos secundários encontrados naturalmente em plantas, cuja estrutura química (1,2-benzopirona) caracteriza-se pela fusão dos anéis benzeno e α -pirona. Este composto é metabolizado pelo ser humano no fígado, dando origem à 7-hidroxicoumarina (Figura 2.2).

As coumarinas, desde as mais simples às mais complexas são descritas como uma fonte natural de interesse terapêutico pelas suas propriedades farmacológicas e possíveis aplicações. Neste sentido, a construção de uma ferramenta que permita estudar o efeito desta e de outras drogas ao nível do stresse oxidativo é uma mais-valia na compreensão e avaliação do potencial terapêutico e um contributo na aplicação futura de compostos naturais e comparação com os sintéticos no ramo da farmacologia em medicina.

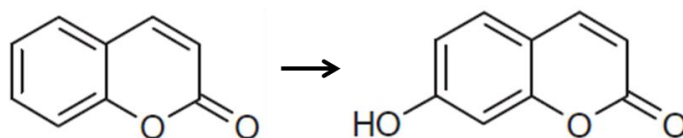


Figura 2.2– Estrutura química da coumarina e composto derivado 7-hidroxycoumarina (umbeliferona). Imagem adaptada a partir de [4].

3. METODOLOGIA

3.1 Equipamento relevante de laboratório

- Centrifugadoras de bancada refrigeradas: 5417 C rotor FA-45-30-11 e 5424 R rotor FA-45-24-11 da marca eppendorf.
- Incubadores: Heraeus BK 600, Minitron Infors HT.
- Espectrofotômetro: Helios β , Spectronic Unicam.
- Termocicladores: T1 Whatman Biometra, versão do *software* 4.16 e TGradient Whatman Biometra, versão do *software* 4.15.
- Sistema de aquisição de imagens: Alliance 4.7, Uvitec Cambridge.
- Microscópios de fluorescência invertidos: Axio Vert.A1 Carl Zeiss e IX50 Olympus.
- Microscópio de fluorescência não invertido: Leica DM 5500 B.

3.2 Material biológico, meios de cultura e condições de crescimento

As estirpes haploides originais de *S. cerevisiae* selecionadas para o desenvolvimento do projeto estão apresentadas na Tabela 3.1. Estas estirpes parentais têm separadamente os fatores de transcrição Yap1 e Msn2 em fusão com a proteína fluorescente Gfp (*A-GFP*), ou um transportador deletado (*TA*) dos três previamente escolhidos *TxA*, *TyA* e *TzA*, respectivamente. Um dos transportadores selecionados corresponde à família MFS situado na membrana celular e dois correspondem à família ABC, um da membrana do vacúolo e outro da membrana plasmática. As estirpes são mantidas a -80° C em glicerol a 20%.

Os meios de cultura usados para a cultura e manutenção das estirpes de *S. cerevisiae* são *Yeast peptone dextrose* (YPD), como meio rico e *Synthetic complete* (SC) como meio definido e também seletivo na ausência de determinados marcadores auxotróficos, consultar Tabela 7.1 nos anexos. Todos os meios usados são previamente autoclavados a 121° C durante 20 minutos. As condições de crescimento ótimas são para a temperatura entre os 28° C e 30° C, para a agitação quando necessária entre os 180 e 200 rpm, dependendo do meio de cultura, do volume a usar e do método aplicado. A reativação das estirpes a -80° C implica a incubação durante três dias a 28° C em meio YPD, sendo

repicadas para novo meio durante mais três dias. Por sua vez, a reativação das estirpes a 4° C com menos de um mês implica a incubação durante três dias a 28° C em meio YPD.

Tabela 3.1 – Estirpes haploides parentais de *S. cerevisiae*.

Estirpe	Genótipo relevante	Origem
<i>YAP1-GFP</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YAP1-GFP_his3MX6</i>	Invitrogen
<i>MSN2-GFP</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; MSN2-GFP_his3MX6</i>	Invitrogen
<i>TxΔ</i>	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; TxΔ::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>TyΔ</i>	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; TyΔ::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>TzΔ</i>	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; TzΔ::kanMX4</i>	Euroscarf

3.3 Construção de estirpes *Saccharomyces cerevisiae* mutantes

Em *S. cerevisiae* o tipo de *mating* é determinado por dois alelos diferentes do *locus mating-type* (*MAT*). Na sua forma haploide pode ser *MATα* ou *MATa*, na forma diploide é *MATα/MATa* pela conjugação de tipos de haploides com *MAT* opostos. As células no estado diploide têm a capacidade de formar esporos haploides por meiose, quando sujeitas a condições nutricionais limitantes [44]. Tendo em conta estas características, o objetivo consiste em construir estirpes de *S. cerevisiae* haploides a partir das estirpes parentais (Tabela 3.1) que sejam deletadas para cada um dos transportadores supracitados (*TxA*, *TyA* e *TzA*) envolvidos na eliminação de drogas, e em simultâneo expressando cada um dos ativadores fundidos à proteína Gfp (*A-GFP*). Para tal, será feita a conjugação das estirpes originais e conseqüentemente a esporulação dos diploides resultantes (Figura 3.1, parte A), de modo a obter seis cruzamentos diferentes que combinem em simultâneo a deleção de apenas um dos transportadores, com cada um dos ativadores em fusão com a Gfp de forma independente (Tabela 3.2), permitindo um estudo comparativo e ao mesmo tempo certificar que estas células mutadas sejam viáveis e não demasiado sensíveis.

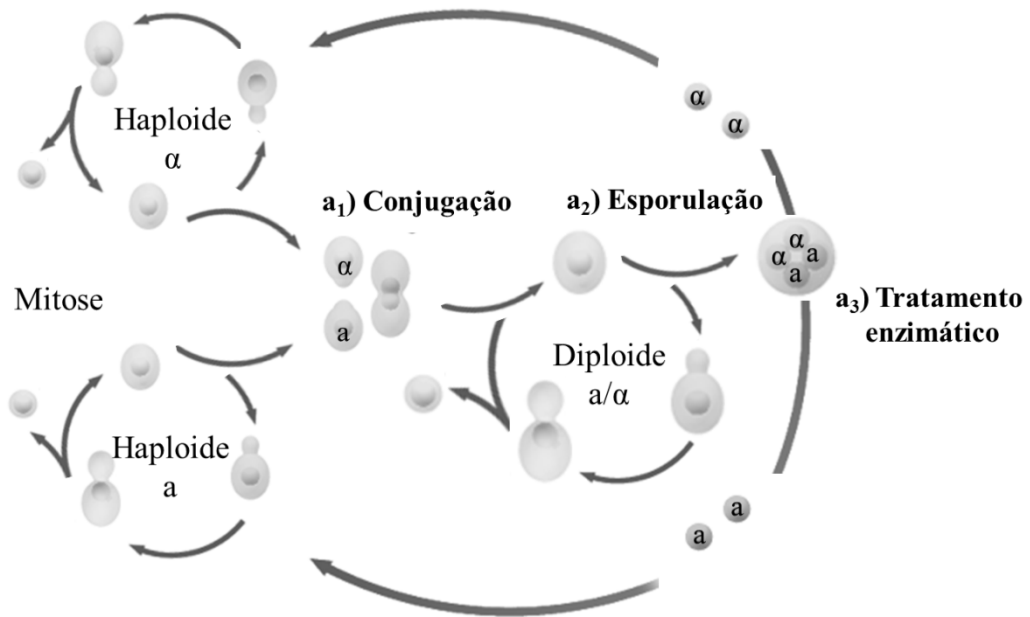
Tabela 3.2 – Apresentação dos seis cruzamentos e respetivo genótipo para os diploides.

Estirpe	Genótipo relevante
<i>Tx</i> Δ <i>YAP1-GFP</i>	<i>MAT</i> α / <i>MAT</i> <i>a</i> ; <i>lys2</i> Δ 0; <i>Tx</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>met15</i> Δ 0; <i>YAP1-GFP_his3MX6</i>
<i>Tx</i> Δ <i>MSN2-GFP</i>	<i>MAT</i> α / <i>MAT</i> <i>a</i> ; <i>lys2</i> Δ 0; <i>Tx</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>met15</i> Δ 0; <i>MSN2-GFP_his3MX6</i>
<i>Ty</i> Δ <i>YAP1-GFP</i>	<i>MAT</i> α / <i>MAT</i> <i>a</i> ; <i>lys2</i> Δ 0; <i>Ty</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>met15</i> Δ 0; <i>YAP1-GFP_his3MX6</i>
<i>Ty</i> Δ <i>MSN2-GFP</i>	<i>MAT</i> α / <i>MAT</i> <i>a</i> ; <i>lys2</i> Δ 0; <i>Ty</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>met15</i> Δ 0; <i>MSN2-GFP_his3MX6</i>
<i>Tz</i> Δ <i>YAP1-GFP</i>	<i>MAT</i> α / <i>MAT</i> <i>a</i> ; <i>lys2</i> Δ 0; <i>Tz</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>met15</i> Δ 0; <i>YAP1-GFP_his3MX6</i>
<i>Tz</i> Δ <i>MSN2-GFP</i>	<i>MAT</i> α / <i>MAT</i> <i>a</i> ; <i>lys2</i> Δ 0; <i>Tz</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>met15</i> Δ 0; <i>MSN2-GFP_his3MX6</i>

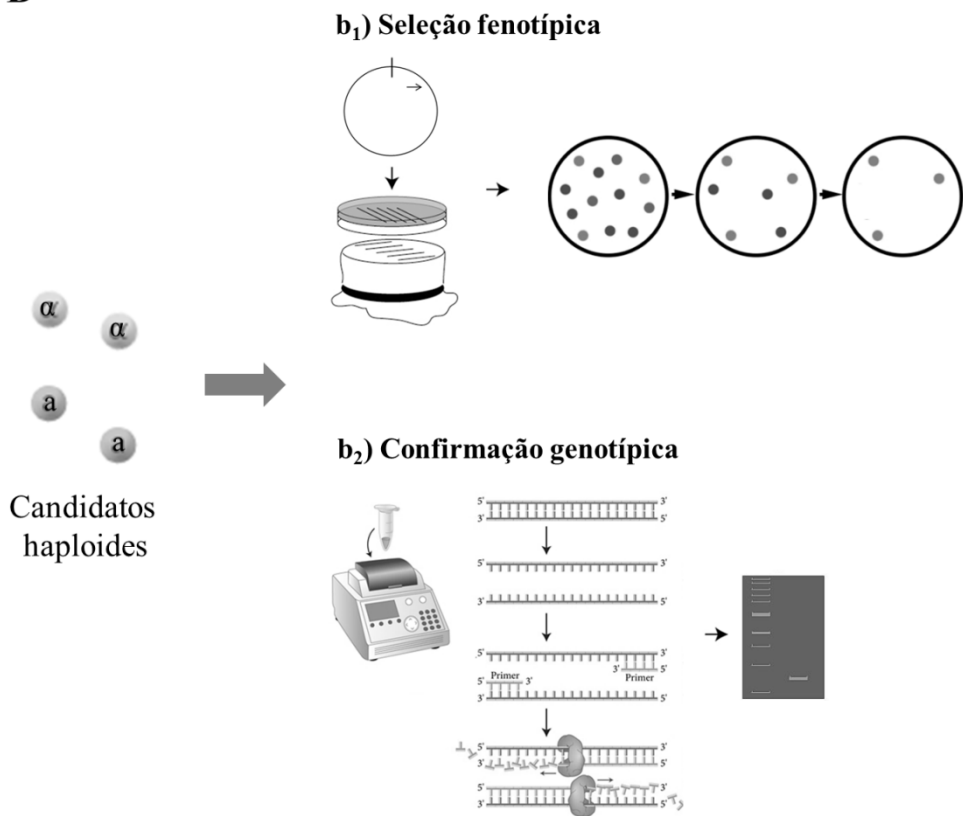
3.3.1 Cruzamento de haploides *Saccharomyces cerevisiae* e seleção dos diploides obtidos

Para construir os diploides usaram-se as estirpes originais haploides (Tabela 3.1) já reativadas e com 3 dias de crescimento a 28°C em meio sólido YPD. Posteriormente inocularam-se as estirpes paralelamente em meio líquido fresco YPD e SC completo, foram incubadas a 28°C, 200 rpm durante ~16 horas. Procedeu-se à mistura do volume calculado para cada estirpe, de modo a igualar o número de células de *MAT* oposto (*MAT**a* e *MAT* α) do mesmo cruzamento, para um volume final de 2,5 mL e densidade ótica (DO₆₀₀) da que apresente menor valor. Acrescentou-se a cada um dos seis cruzamentos mais 5 mL de meio líquido fresco YPD e SC, respetivamente, e colocou-se a 28°C sem agitação durante 24 horas. Ressuspendeu-se as células do cruzamento, centrifugou-se 300 μ L de cada suspensão a 7000 rpm durante 1 minuto, lavou-se as células com 300 μ L de solução de desagregação a pH 8 (Tabela 7.2), centrifugou-se novamente nas mesmas condições e ressuspendeu-se o *pellet* em 300 μ L de H₂O estéril. Por fim, plaqueou-se individualmente 150 μ L de cada suspensão em meio sólido seletivo SC-Lys-Met e selecionou-se aleatoriamente 12 colónias de cada um dos seis cruzamentos provenientes da conjugação em meio YPD. Congelou-se no total 72 diploides a -80°C.

A



B



C

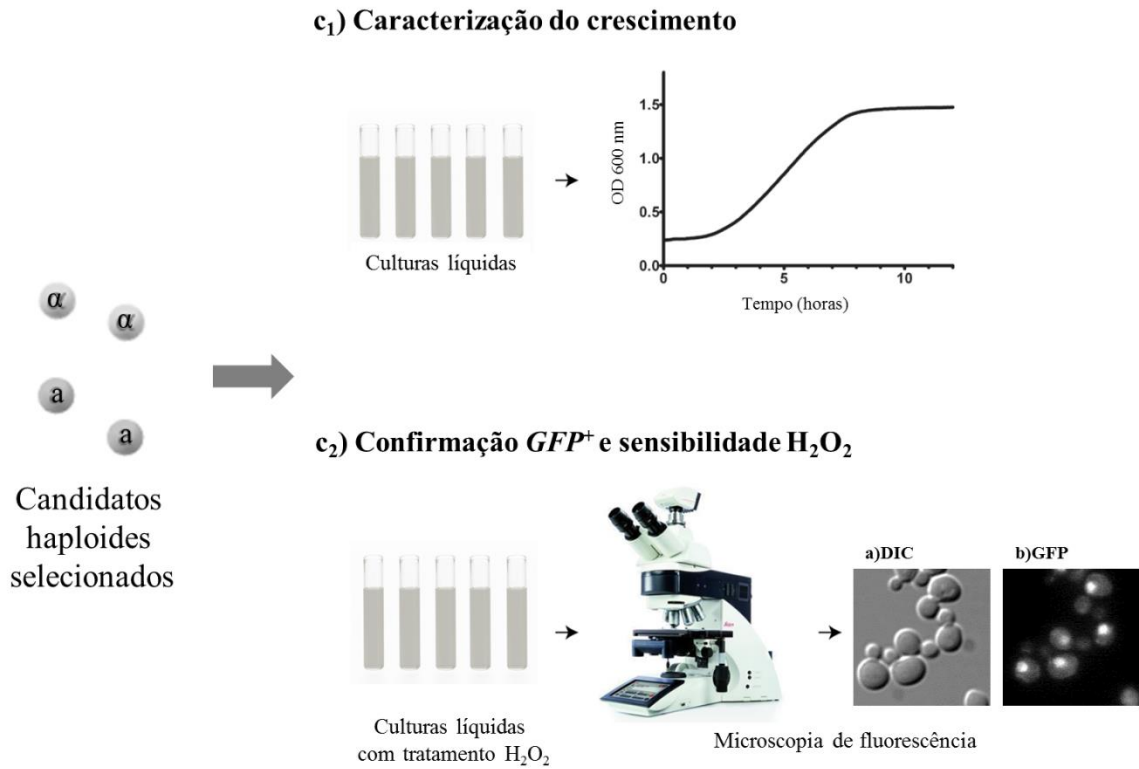


Figura 3.1 – Esquema ilustrativo da metodologia usada, com imagem de *SGD wiki e Science aid webpage* adaptadas. **A** – Construção das estirpes de *S. cerevisiae* haploides no contexto do ciclo de vida da levedura (etapas: a₁, a₂ e a₃); **B** – Seleção e confirmação das estirpes haploides construídas (etapas: b₁ e b₂); **C** – Caracterização das estirpes e confirmação ao nível da sensibilidade ao H₂O₂ (etapas: c₁ e c₂).

3.3.2 Confirmação preliminar dos diploides por microscopia de fluorescência

Para verificar se os diploides provenientes da conjugação dos haploides parentais tinham os fatores de transcrição em fusão com a Gfp, recorreu-se a ensaios de microscopia de fluorescência em condições de stresse oxidativo desencadeadas pelo H₂O₂, de modo a localizar na célula os ativadores. Esta confirmação dos diploides foi realizada em culturas em meio sólido em *live imaging*, com tratamento de 5 µL de H₂O₂ a 1 mM e 0,25 mM, com tempos variáveis desde a aplicação do H₂O₂ durante a preparação à observação ao microscópio. E em cultura líquida com tratamento de H₂O₂ a 0,25 mM durante 10 minutos, fixação das células com formaldeído e meio de montagem com glicerol e DABCO. Para a cultura em meio sólido foi usado o microscópio de fluorescência invertido Axio Vert.A1 Carl Zeiss em campo claro com 10 ms de exposição, e com o filtro da fluorescência para a Gfp (BP 475-495 nm e LP 515 nm) com 2000 ms de exposição. Para a cultura em meio líquido, foi usado o microscópio de fluorescência invertido IX50 Olympus, com o filtro contraste de interferência diferencial (DIC) com 500 ms de exposição e o filtro da fluorescência para a Gfp com 2500 ms de exposição. O processamento das fotos da microscopia e a respetiva contagem de células foi feito recorrendo aos programas de edição de imagem ImageJ v1.48 e Adobe Photoshop CS5 v12.0. Para cada diploide é calculado a soma do número total de células contadas em DIC, a soma do número total de células com fluorescência, a soma do número de células com fluorescência nuclear, a média da percentagem de células com fluorescência da Gfp e a média da percentagem de células com sinal nuclear fluorescente da Gfp, tendo em conta as fórmulas:

$$\% GFP^+ = \frac{\text{Número de células com fluorescência}}{\text{Número total de células em DIC ou CC}} \times 100$$

$$\% GFP\ nuclear^+ = \frac{\text{Número de células com sinal GFP nuclear}}{\text{Número total de células com fluorescência}} \times 100$$

O uso dos respetivos microscópios de fluorescência variou de acordo com a disponibilidade dos equipamentos.

3.3.3 Esporulação dos diploides e seleção aleatória dos esporos

Após a confirmação preliminar dos diploides *GFP*⁺, foram selecionados aqueles, nos quais se observou sinal nuclear, para proceder à esporulação. A esporulação realizou-se em meio sólido e em meio líquido. Em meio sólido, fez-se as pré-culturas em 3 mL de meio líquido YPD a 28°C, no *Minitron* durante ~16 horas. Lavou-se 300 µL da suspensão com 300 µL de solução de desagregação a pH 8, centrifugou-se a 7000 rpm durante 2 minutos e ressuspendeu-se o *pellet* em 300 µL de solução de desagregação. Inoculou-se 150 µL em placas com meio de esporulação sólido feito como descrito nos protocolos do Laboratório (Tabela 7.1 dos anexos). Após 24 horas à temperatura ambiente, colocou-se as placas durante 5 dias a 28°C. Na esporulação em meio líquido, fez-se as pré-culturas em meio de pré-esporulação sólido a 28°C sem agitação, durante 24 horas. De seguida, inoculou-se as pré-culturas em 2 mL de meio líquido de esporulação [13] (Tabela 7.1), colocou-se num *roller* durante 5 dias à temperatura ambiente e, posteriormente colocou-se a 28°C durante 3 dias. Em ambos os métodos monitorizou-se a extensão da esporulação, observando a formação de tétrades por microscopia ótica.

Quando cerca de 50% da população observada ao microscópio ótico eram tétrades, procedeu-se à libertação dos esporos haploides formados por tratamento enzimático (Figura 3.1, secção a₃). Colocou-se um *patch* de células provenientes da esporulação num microtubo com 200 µL de H₂O e 5 µL de glusulase, adicionou-se microesferas de vidro (0,5 mm) até ¼ do microtubo, agitou-se no *vortex* e colocou-se num banho a 30°C durante 1 hora. Depois voltou-se a agitar no *vortex* durante 15 segundos e observou-se ao microscópio ótico de 20 em 20 minutos. Fez-se diluições sucessivas 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ de cada suspensão, plaqueou-se 200 µL em meio sólido seletivo SC-Lys em triplicado e incubou-se a 28°C durante 3 dias. Selecionou-se as placas SC-Lys com colónias individuais, repicou-se aleatoriamente cerca de 1000 colónias por cada diploide de origem em novas placas SC-Lys, incubou-se a 28°C durante 3 dias.

3.4 Seleção das estirpes *Saccharomyces cerevisiae* haploides

Os esporos selecionados aleatoriamente podem apresentar várias combinações de genótipo, resultantes do processo de meiose. No entanto, pretende-se selecionar apenas aqueles cujo

genótipo relevante é *his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 LYS2 G418^R A-GFP_his3MX6*, recorrendo a técnicas de microbiologia e biologia molecular (Figura 3.1, parte B).

3.4.1 Seleção auxotrófica e por resistência à geneticina G418

As estirpes parentais com os transportadores deletados, têm a *cassette* com o gene *KanMX4* inserido, substituindo a *open reading frame* (ORF) dos transportadores (*TΔ::KanMX4*) [45]. Portanto, todas as estirpes deletadas para cada um dos transportadores possuem o gene *KanMX4* que confere às leveduras resistência ao antibiótico G418. Deste modo, é feita uma seleção complementar fenotípica usando meios definidos e específicos, de acordo com os marcadores auxotróficos e o antibiótico referido.

Neste sentido, procede-se à réplica das placas SC-Lys com os candidatos haploides (esporos) a selecionar, utilizando um bloco/*stamp* envolvido em veludos estéreis, de modo a transferir as células para placas com meio seletivo segundo a ordem estratégica: (1) SC-Met e SC-His; (2) YPD G418; (3) SC complete e SC-Lys-Met; (4) SC-Lys e SC-Met (Tabela 7.1, anexos).

3.4.2 Confirmação molecular das estirpes *GFP⁺* e *TΔ*

Após a seleção do fenótipo e antes de prosseguir para a microscopia de fluorescência, é necessário garantir que os candidatos não são diploides, confirmar se são *GFP⁺* e deletados para cada um dos transportadores escolhidos, respetivamente. Para tal, procedeu-se à extração do ADN genómico dos candidatos haploides, de acordo com o protocolo [46]. Posteriormente realizou-se o método de PCR *standard* no termociclador T1, cujas condições otimizadas de reação são 55°C para a temperatura de *annealing* dos *primers* e 4 minutos para o tempo de extensão da enzima Taq ADN polimerase da *Invitrogen*, para um total de 30 ciclos. Os *primers*, apresentados na Tabela 3.3, foram selecionados e construídos de acordo com os genes específicos a amplificar que confirmem o genótipo relevante pretendido para as estirpes em análise. Depois da reação de PCR que amplifica especificamente o ADN realizou-se a eletroforese em solução tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,5x, durante 1 hora e 30 minutos ou 1 hora e 40 minutos a 90 V ou 100 V respetivamente. Observou-se os resultados em géis de agarose a 1% e 1,5% corados com

brometo de etídio, cujas fotos foram adquiridas com radiação UV no equipamento Alliance 4.7 da Uvitec e processadas no programa ImageJ v1.48, permitindo confirmar ao nível molecular as estirpes haploides construídas com o genótipo (*TΔ A-GFP*) para cada uma das seis combinações.

Tabela 3.3 – *Primers* selecionados para as reações de PCR e respetivo propósito.

Propósito	Primers	Alvo	Sequência dos primers
Confirmar estirpes <i>YAPI-GFP</i>	A ₁	<i>YAPI</i>	5'ATGAGTGTGTCTACCGCCAAG3' 5'CCCAGTTTTCCATAAAGTTCCCGC3'
	A ₂	<i>YAPI-GFP</i>	5'ATGAGTGTGTCTACCGCCAAG3' 5'TTTGTATAGTTCATCCATGC3'
Confirmar estirpes <i>MSN2-GFP</i>	B ₁	<i>MSN2-GFP</i>	5'ATGACGGTCGACCATGATTC3' 5'TTTGTATAGTTCATCCATGC3'
	B ₂	<i>MSN2</i>	5'CTAATTCTACTCCAAATTTTCGATC3' 5'GGCGGGGGAAGTGAATTCC3'
Confirmar estirpes <i>TxΔ::KanMX4</i>	C ₁	<i>Tx</i>	
	C ₂	<i>TxΔ</i>	
Confirmar estirpes <i>TyΔ::KanMX4</i>	D ₁	<i>Ty</i>	<i>Primers</i> selecionados de acordo com <i>EUROSCARF</i> – <i>EURO</i> pean <i>Saccharomyces</i> <i>Cerevisiae</i> <i>AR</i> chive for <i>F</i> unction <i>A</i> nalysis
	D ₂	<i>TyΔ</i>	
Confirmar estirpes <i>TzΔ::KanMX4</i>	E ₁	<i>Tz</i>	
	E ₂	<i>TzΔ</i>	

3.5 Caracterização do crescimento celular através de curvas de crescimento

O crescimento das leveduras *S. cerevisiae* pode ser analisado através da medição periódica da turbidez da cultura em meio líquido, designada por DO, a um determinado comprimento de onda, permitindo a construção de curvas de crescimento como ilustrado na Figura 3.1, secção c₁. A DO₆₀₀ determinada no espectrofotómetro é resultado da dispersão da luz emitida a um comprimento de onda de 600 nm, causada pela presença das células em suspensão. À medida que as células aumentam de tamanho ou se multiplicam, a turbidez da solução aumenta e, conseqüentemente é determinada a densidade da cultura através da luz dispersada. Para analisar a proliferação dos candidatos haploides anteriormente selecionados, são efetuadas pré-culturas em meio SC líquido durante ~18 horas a 28°C a 180 rpm. De seguida, estas culturas são lançadas em meio SC líquido a uma DO₆₀₀ de 0,1

efetuando a medição periódica da DO₆₀₀ ao fim de 4 horas e posteriormente de 2 em 2 horas. O controlo para esta análise são as estirpes parentais *YAPI-GFP* e *MSN2-GFP* com os alelos selvagens para os transportadores.

3.6 Confirmação final do genótipo *GFP*⁺ das estirpes haploides, determinação da sensibilidade ao H₂O₂ por microscopia de fluorescência

Este ensaio tem como objetivo observar o sinal nuclear da proteína Gfp nas estirpes haploides construídas por microscopia de fluorescência, e comparar com as estirpes controlo *YAPI-GFP* e *MSN2-GFP*, quando sujeitas a um tratamento com H₂O₂ a uma concentração de 0,25 mM durante 10 minutos (Figura 3.1, secção c₂). As células são inoculadas em meio líquido SC completo a DO₆₀₀ de 0,1 após uma pré-cultura em meio SC completo durante ~18 horas. Ao atingir a DO₆₀₀ entre 0,6 - 0,7 são sujeitas ao tratamento. Posteriormente, as células são fixadas com formaldeído a 3,7% e lavadas com tampão fosfato salino 1x (PBS) (Tabela 7.2, anexos). O meio de montagem para as observações ao microscópio é glicerol e DABCO, tendo sido adicionado posteriormente o corante azul fluorescente DAPI a 14,3 µM. O microscópio de fluorescência usado foi o Leica DM 5500 B aplicando três filtros diferentes apresentados na Tabela 3.4, de modo a monitorizar a localização da proteína Gfp, bem como observar a localização dos núcleos das células marcando o ADN. A aquisição de imagens foi feita com o *software* LasAF, v4.4.0. O processamento das fotos da microscopia, a respetiva contagem de células e cálculos efetuados é feito como descrito na alínea 3.3.2. O uso do microscópio de fluorescência variou de acordo com a disponibilidade do equipamento.

Tabela 3.4 - Filtros do microscópio Leica DM 5500 B usados, respetivo propósito de utilização, comprimentos de ondas (excitação e emissão) e tempo de exposição aplicado.

Filtro	Propósito	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Tempo de exposição (ms)
DIC	Permite observar as células com contraste de interferência diferencial.	-	-	10 - 250
FITC	Filtro para isocianato de fluoresceína que permite localizar a proteína Gfp nas células.	495	519	2000 - 2500
DAPI	Filtro para o corante fluorescente DAPI que se liga ao ADN, ARN e permite observar os núcleos das células.	359	461	200 - 600

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção de estirpes haploides mutantes *Saccharomyces cerevisiae*

O processo de construção de novas estirpes de *S. cerevisiae* torna-se simples já que a meiose e a esporulação fazem parte do ciclo de vida da levedura ilustrado na Figura 3.1, parte A. Os diploides são construídos a partir de estirpes haploides parentais que contribuirão com alguns marcadores úteis nos haploides resultantes.

4.1.1 O cruzamento dos haploides, seleção e confirmação de diploides

O método de conjugação dos haploides parentais pode ser feito em meio líquido ou sólido. Neste caso optou-se pelo meio líquido, de modo a que as células tenham maior superfície de contacto entre elas e assim mais facilmente se unam. Segundo a literatura, ao fim de 4 horas a 30°C já é possível observar a junção das células de *MAT* oposto [47], contudo neste caso apenas se observou após 24 horas a 28°C ao adicionar meio fresco. Em paralelo testou-se dois meios diferentes, YPD e SC, para tentar perceber como estas novas estirpes conjugaram dependendo do tipo de meio.

Foi escolhido o meio seletivo SC-Lys-Met para garantir apenas a seleção do crescimento de diploides (*MATa/α*) e excluir possíveis haploides que não se tenham conjugado, já que os diploides provêm da combinação das estirpes parentais haploides deletados para os transportadores cujo genótipo é *TA lysΔ MET* e com os ativadores em fusão com a Gfp com genótipo *A-GFP metΔ LYS*, portanto aqueles que não crescerem neste meio são células haploides que são deletados para *LYS* ou para *MET* [48]. Ao plaquear no meio seletivo SC-Lys-met as células dos cruzamentos, verificou-se a formação abundante de colónias das procedentes do YPD, contrastante com as do meio SC, onde não foi visível a formação de colónias como se pode analisar na Figura 4.1. Portanto, por um lado o meio YPD revela-se eficaz na conjugação realizada com estas estirpes, e por outro os resultados do meio SC não são comparáveis nem significativos para seguir para a esporulação ou concluir que as estirpes não se conjugaram devido ao meio.

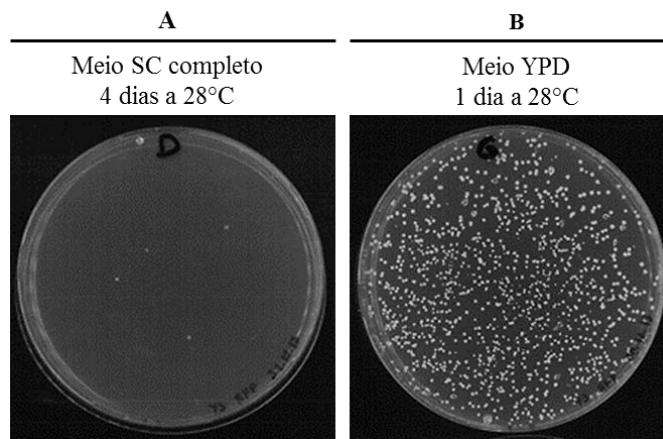


Figura 4.1 – Placas SC-Lys-Met com diploides provenientes da conjugação das estirpes parentais em dois meios diferentes.

Por conseguinte, foram repicados aleatoriamente das placas SC-Lys-Met 72 diploides provenientes da conjugação em YPD, 12 de cada um dos cruzamentos (Tabela 7.3 nos anexos). Estes diploides foram sujeitos a um ensaio preliminar de microscopia de fluorescência para poder confirmar se estes são GFP^+ , assegurando assim a validade destes diploides e permitir a realização das etapas seguintes para a construção das estirpes pretendidas ou optar pela repetição do processo de conjugação caso não se verifique que os diploides são GFP^+ . É importante ter em conta que um diploide tem no seu genoma não só os genes que codificam os fatores de transcrição em fusão com a Gfp, como também os mesmos genes sem a proteína em fusão. Logo, é mais relevante verificar a fluorescência das células do que o sinal nuclear da Gfp, uma vez que a ação do H_2O_2 pode despoletar a ativação dos fatores de transcrição sem a Gfp que ficam aprisionados no núcleo, não sendo possível observar o sinal nuclear de fluorescência, não significando por isso que esta resposta não seja válida. Assim, para prosseguir pretendeu-se observar pelo menos as células com fluorescência.

Em primeiro lugar, foi observado ao microscópio de fluorescência em *live imaging* diploides de culturas em meio sólido SC-Lys-Met, aplicando o H_2O_2 a uma concentração de 0,25 mM, uma vez que se trata de uma concentração já testada no âmbito de trabalho anterior do grupo *Yeast Stress* (IGC, LFernandes), e se sabe capaz de desencadear a localização nuclear dos ativadores Msn2 e Yap1. Estas observações foram realizadas em células diploides com tempos de incubação entre os 5 e os 13 dias a 28°C e posterior a

adição de H_2O_2 em *live*. Na Figura 4.2 observa-se localização nuclear no diploide yRP6#12 com 7 dias de incubação, ao passo que com 13 dias de incubação para além de não se verificar localização nuclear, existem células visíveis em campo claro com diferenças no aspeto morfológico que não são visíveis com o filtro para a Gfp, ou seja, deixam de apresentar fluorescência quando danificadas ou mortas, devido a alterações fisiológicas nas células ou à libertação do conteúdo intracelular pela modificação morfológica da membrana. Pois, ao longo do tempo de incubação as células começam a ficar danificadas, deixando de apresentar sinal nuclear para a Gfp ou até não apresentando fluorescência quando expostas ao H_2O_2 .

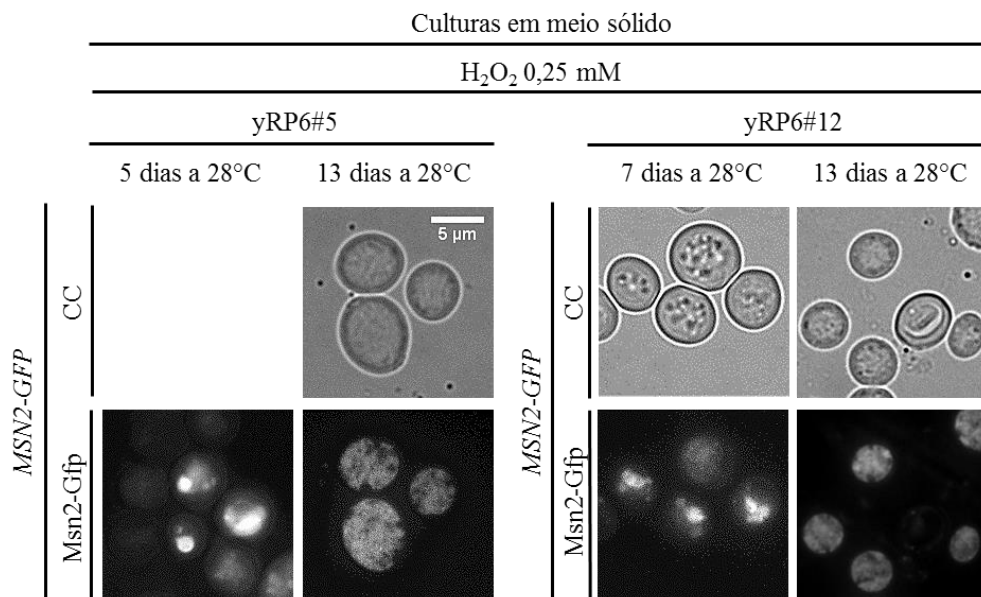


Figura 4.2 – Células dos diploides de meio sólido com adição de H_2O_2 em *live imaging*. Fotos adquiridas no microscópio de fluorescência invertido Axio vert.A1 Carl Zeiss em campo claro (CC) e tempo de exposição 10 ms; com o filtro para a Gfp (BP 475-495 nm e LP 515 nm) e tempo de exposição 2000 ms; ampliação total de 1000x.

Está descrito que a localização nuclear dos fatores de transcrição em análise, desencadeada pela ação do H_2O_2 , depende da fase de crescimento em que as células se encontram [2]. Sabe-se que no meio sólido as células estão em estado estacionário, ou seja, num estado não proliferativo caracterizado pela cessação do crescimento e divisão. Além disso, em culturas sólidas não é possível controlar e garantir que todas as células se encontrem exatamente nas mesmas circunstâncias e em simultâneo no mesmo estado de crescimento. Estas culturas estão num meio já seletivo, no qual a falta de nutrientes ao longo do tempo é também um fator de stresse para estas células, podendo ser parte de uma resposta a um stresse mais geral [49]. Também se verifica a perda da viabilidade das células ao fim dos 13 dias e o sinal nuclear observado pode ser não só devido ao stresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 , mas também a outros fatores. Logo, para colmatar esta situação é necessário uniformizar as culturas ao nível da fase de crescimento em que se encontram e o tratamento com o H_2O_2 a que estas são expostas, com o controlo sem tratamento com H_2O_2 .

Neste contexto para assegurar que as células se encontram em fase exponencial, efetuou-se culturas de dois diploides de cada um dos cruzamentos em meio líquido com controlo, isto é a cultura dos mesmos diploides sem o tratamento, e a posterior fixação de todas as células com formaldeído. Este processo de fixação celular, amplamente estudado desde o início do século 20 [50], consiste na rápida penetração do formaldeído nos tecidos e conseqüentemente o gradual *cross-linking* entre proteínas, de modo a preservar a morfologia, composição celular e arquitetura dos tecidos [51]. Desta forma, pode-se garantir que as observações realizadas refletem o estado e resposta das células no instante em que se procedeu à fixação, minimizando a variação do tempo de exposição ao H_2O_2 e garantindo fiabilidade nos resultados observados na microscopia. Complementarmente à fixação foi usado como meio de montagem DABCO e glicerol, comumente utilizado em microscopia de fluorescência, de modo a preservar o sinal da Gfp quando as amostras são mantidas no escuro.

Por sua vez, os resultados obtidos nas culturas em meio líquido permitiram validar os diploides analisados como Gfp⁺, apesar de não ter sido evidente o sinal nuclear da Gfp nas células com o tratamento (Figura 4.3). Isto tendo em conta que o sinal de fluorescência observado nas células sem o H₂O₂ deve-se à fluorescência da Gfp e não a autofluorescência. Para tal efetuou-se lavagens com solução tampão fosfato (PBS) após a adição do formaldeído no processo de fixação realizado, aplicou-se o meio de montagem com DABCO e glicerol para preservar o sinal da proteína Gfp e usou-se o filtro *long-pass* (FITC) no microscópio de fluorescência que minimiza a autofluorescência na medida que seleciona comprimentos de onda de emissão e excitação específicos para captar o sinal da Gfp [52]. Esta análise dúbia justifica-se pelo facto de serem diploides, porém como foi possível observar fluorescência tanto nas células controlo como nas que foram sujeitas ao tratamento, prossegue-se à próxima fase de esporulação.

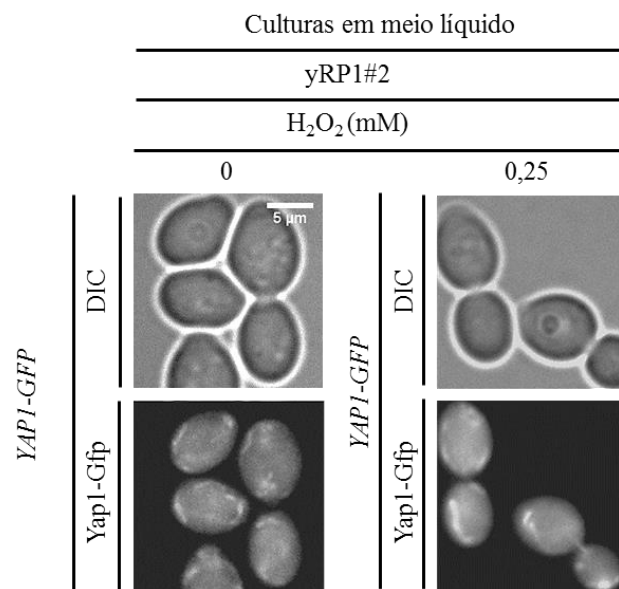


Figura 4.3 – Células diploides em meio líquido com tratamento de H₂O₂ 10 minutos e fixação com formaldeído. Fotos adquiridas no microscópio de fluorescência invertido Olympus IX50 com o filtro para a Gfp e tempo de exposição 2500 ms; e com filtro para DIC e tempo de exposição 500 ms; ampliação total 1000x.

4.1.2 A esporulação de diploides

A formação de esporos é induzida pela escassez no meio das fontes de azoto e carbono. Nestas condições, um diploide gera por meiose quatro esporos envolvidos no *ascus*, designando-se por tétrade [47]. Tendo em conta que durante a meiose resultam várias novas combinações de cromossomas pela segregação independente de cromossomas homólogos e recombinação entre cromossomas, este processo permite a construção das novas estirpes de *S. cerevisiae* [13], sendo necessário a posterior seleção do genoma pretendido. Como não se sabe o procedimento mais eficiente para a esporulação dos diploides obtidos, houve a necessidade de testar o método da esporulação em meio líquido e sólido. Optou-se pela esporulação em meio sólido, devido à observação pretendida de tétrades ao microscópio ótico e, já que este método em meio líquido não foi conclusivo.

Foi necessário proceder ao método da esporulação de diploides três vezes independentes para assegurar a obtenção de pelo menos três haploides provenientes de cada um dos seis cruzamentos, já selecionadas fenotipicamente e ao nível molecular. Isto porque, para cada um dos diploides com genótipo *TA A-GFP* de cada uma das seis combinações, existe teoricamente cerca de 32 possibilidades de genótipo diferentes das quais 4 reúnem o genótipo pretendido para os haploides resultantes da esporulação (Tabela 7.5 dos anexos). Além disso as diluições efetuadas para o plaqueamento dos esporos obtidos na esporulação em placas SC-Lys influenciaram a fase seguinte de repicagem aleatória dos esporos e por isso a eficiência do método, pois inicialmente a menores diluições (10^{-2} , 10^{-3}) os esporos ficavam muito próximos nas placas, podendo voltar a cruzar quando de *MAT* oposto. Deste modo, na segunda e terceira esporulação efetuou-se mais uma diluição 10^{-4} para evitar a junção dos esporos, tendo em média cerca de 480 esporos por cruzamento de cada esporulação que posteriormente são sujeitos à seleção fenotípica e confirmação do genótipo.

Para cada esporulação independente e respetiva seleção aleatória dos esporos é necessário cerca de 26 dias. Este procedimento envolve 4 dias para reativar os diploides armazenados a -80°C ; 1 dia para a realização de pré-culturas dos diploides em meio rico YPD ficando a incubar a 28°C e 200 rpm durante ~16 horas; 15 dias para o processo de formação dos esporos nas placas com o meio sólido com acetato de potássio (1%) (Tabela 7.1 dos

anexos), monitorizando a formação de tétrades ao microscópio ótico e observando a formação de um tapete de células nas placas; e por fim 6 dias para o tratamento enzimático, repicagem aleatória dos esporos obtidos e consequente seleção por plaqueamento em meio seletivo. Este último passo é um método alternativo à dissecação de tétrades, menos moroso e útil para obter um número elevado de esporos, permitindo a libertação dos esporos que formam tétrades, através da degradação da parede do *ascus* envolvente pela ação da glusulase, uma enzima extraída do caracol [47, 53].

Posteriormente, os esporos são plaqueados diretamente em meio sólido SC-Lys apropriado para selecionar todas as células representantes que tenham no genoma o gene *LYS*. Ao fim de 2 dias de incubação a 28°C seleciona-se de forma aleatória, provenientes de cada um dos cruzamento, cerca de 1000 colónias que sejam individuais, pois células com tipo de *MAT* oposto podem facilmente se unir e formar diploides novamente (ver capítulo 3, alínea 3.3.1). Estas colónias são repicadas em novo meio seletivo SC-Lys e incubadas durante 2 dias a 28°C, obtendo-se assim os candidatos haploides das novas estirpes de *S. cerevisiae*, tendo que ser submetidos ao teste individual a nível do fenótipo e genótipo, fundamental para a verificar que são haploides e selecionar apenas aqueles com o genótipo de interesse.

4.2 Seleção fenotípica e confirmação molecular das estirpes haploides

Os candidatos haploides obtidos anteriormente foram testados de acordo com as suas exigências nutricionais por análise fenotípica, desta forma as colónias de *S. cerevisiae* foram rastreadas para o genótipo pretendido pela técnica de *replica plating*, descrita no capítulo 3, alínea 3.4.1. Partindo das placas SC-Lys com os candidatos haploides, procedeu-se à respetiva seleção por quatro etapas diferentes usando meios seletivos distintos (Tabela 7.1 dos anexos), cuja ordem estratégica está representada na Figura 4.4. Desta forma, verificou-se a capacidade ou incapacidade de proliferação celular dos candidatos pela observação da formação de colónias, quando colocados nos diferentes meios, escolhendo aqueles que tinham o genótipo que se pretende.

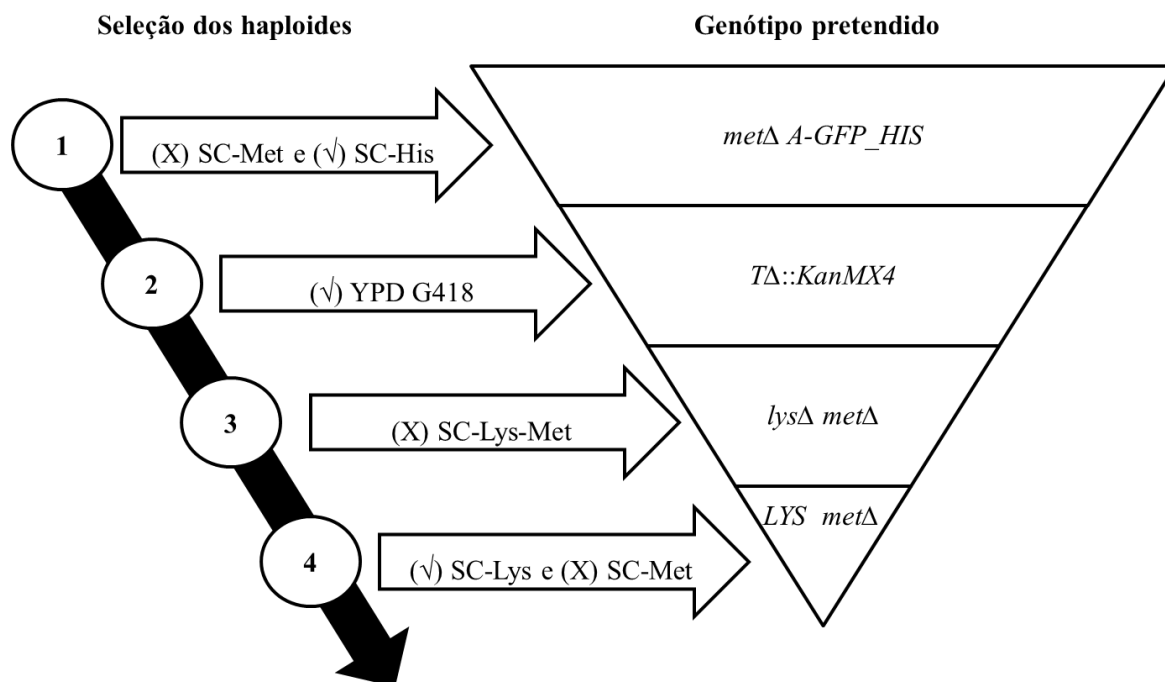


Figura 4.4 – Esquema das etapas da análise fenotípica e seleção dos candidatos haploides de acordo com o genótipo pretendido. O símbolo (X) significa não ocorrência de proliferação celular e o símbolo (✓) significa a ocorrência de proliferação celular.

Esta seleção decrescente partiu do número total de esporos obtidos de cada um dos cruzamentos, tendo sido gradualmente reduzido por análise fenotípica, como representado na pirâmide da Figura 4.4. Este rastreio foi feito de forma progressiva, isto é, os candidatos selecionados na primeira etapa é que passaram à seleção da próxima e assim sucessivamente. Na primeira etapa os haploides escolhidos foram aqueles que não proliferaram em SC-Met (genótipo: *metΔ*) e proliferaram em SC-His (genótipo: *A-GFP_his3MX6*), sabendo que as estirpes parentais contêm na mesma *cassette* o gene *HIS* e o gene que expressa o respetivo ativador em fusão com Gfp. Na segunda etapa selecionou-se aqueles que proliferaram no meio YPD G418, sendo os resistentes ao antibiótico e portanto confirma-se que têm um transportador deletado (*TΔ::KanMX4*). Na terceira etapa selecionou-se os que não proliferaram em SC-Lys-Met, ou seja, apenas se prosseguiu com as células haploides e não os diploides que cresceriam neste meio, tendo sido feito um controlo positivo em meio SC completo onde todos os candidatos proliferavam para facilitar a análise. Por fim, na quarta etapa confirmou-se que todos os candidatos anteriormente selecionados proliferavam em SC-Lys e não proliferavam em SC-Met (*LYS metΔ*).

Após a seleção ao nível do fenótipo foi necessário recorrer a um outro método que permitisse confirmar que nenhuma das estirpes selecionadas era diploide e que tinham respetivamente o genótipo específico para cada uma das seis combinações, sem faltar nenhuma delas. Para isso, extraiu-se o ADN genómico dos candidatos já selecionados ao nível do fenótipo, realizou-se a técnica molecular PCR *standard* e a eletroforese em géis de agarose como descrito no capítulo 3 alínea 3.4.2.

Assim, foi confirmado um total de 57 estirpes haploides (Tabela 7.4 dos anexos), dos quais foram escolhidos para cada um dos cruzamentos (*TA A-GFP*) três haploides para caracterizar e avaliar posteriormente o seu crescimento e sensibilidade ao H₂O₂. Para cada um dos 18 haploides escolhidos foi feito todo o procedimento supracitado em duplicado e de forma independente, cujos resultados estão apresentados nas Figura 4.5, Figura 4.6 e Figura 4.7. É importante salientar que para a análise dos resultados, usaram-se as estirpes parentais (Tabela 3.1) como controlo positivo, sabendo que estas contêm no seu genoma os genes *TA* e *A-GFP*. E como controlo negativo usaram-se outras estirpes haploides de *S. cerevisiae*, sabendo que contêm no seu genoma os genes que codificam os transportadores em estudo e os ativadores Msn2 e Yap1 não estão em fusão com a Gfp. Estas estirpes controlo foram sujeitas ao PCR com os mesmos *primers* (Tabela 3.3), tal como os candidatos haploides.

Portanto, resultaram candidatos haploides selecionados por análises ao nível do fenótipo e do genótipo, provenientes de vários diploides em diferentes processos de esporulação, dos quais se escolheram 18 candidatos para a caracterização e análise seguintes (Tabela 4.1). Pode-se verificar que os candidatos haploides de cada uma das combinações de genótipo provêm de duas esporulações diferentes, pois uma só esporulação não foi suficiente para reunir pelo menos três ou mais candidatos por cruzamento.

Tabela 4.1 – Resultados da triagem dos candidatos haploides, provenientes da esporulação de diploides, selecionados fenotipicamente, genotipicamente e os haploides escolhidos para caracterização e análise seguintes.

Estirpe	Esporulação	Diploide original	Nº candidatos haploides		Haploides escolhidos
			Seleção fenotípica	Seleção genotípica	
<i>TxA YAPI-GFP</i>	1 ^a	yRP1#1; yRP1#11	0	0	-
	2 ^a	yRP1#3; yRP1#4; yRP1#6	35	23	yRP7#1, yRP7#2, yRP7#3
<i>TxA MSN2-GFP</i>	1 ^a	yRP2#2; yRP2#8	0	0	-
	2 ^a	yRP2#1; yRP2#3; yRP2#4; yRP2#6	53	6	yRP8#1, yRP8#2, yRP8#3
<i>TyA YAPI-GFP</i>	1 ^a	yRP3#2; yRP3#3	4	3	yRP9#1, yRP9#2, yRP9#3
	3 ^a	yRP3#1	5	3	-
<i>TyA MSN2-GFP</i>	1 ^a	yRP4#1; yRP4#8	3	0	-
	2 ^a	yRP4#2; yRP4#3; yRP4#4; yRP4#6	31	5	yRP10#1, yRP10#2, yRP10#3
<i>TzA YAPI-GFP</i>	1 ^a	yRP5#6; yRP5#11	5	3	-
	3 ^a	yRP5#1	11	6	yRP11#4, yRP11#5, yRP11#6
<i>TzA MSN2-GFP</i>	1 ^a	yRP6#8; yRP6#11	2	1	-
	3 ^a	yRP6#2; yRP6#3	12	8	yRP12#3, yRP12#5, yRP12#8

Na Figura 4.5 verifica-se que no gel 1 para a estirpe parental controlo positivo com genótipo *YAPI-GFP* com o par de *primers* A_1 não há banda, pois o alvo destes *primers* é o gene *YAPI* e portanto não é amplificado já que o gene *YAPI* está em fusão com a ORF *GFP*. Por sua vez, com o par de *primers* A_2 cujo alvo é a sequência *YAPI-GFP*, esta é amplificada sendo visível uma banda de 3 Kb correspondente ao fragmento de ADN *YAPI-GFP*. Para a estirpe parental controlo negativo de genótipo *YAPI* com o par de *primers* A_1 é visível uma banda de 2 Kb correspondente ao fragmento do gene alvo *YAPI* amplificado. Já com o par de *primers* A_2 não há banda, pois o alvo destes *primers* é a sequência *YAPI-GFP* e portanto não há amplificação, pois o gene *YAPI* não está em fusão com a ORF *GFP*. Por comparação com estes controlos, confirma-se o genótipo *YAPI-GFP* para os candidatos yRP7#1, yRP7#2 e yRP7#3.

No gel 2 (Figura 4.5) para a estirpe parental controlo positivo de genótipo *TxΔ* com o par de *primers* C_1 não há banda, pois o alvo destes *primers* é o gene *Tx* e portanto não é amplificado já que *Tx* está deletado. Por sua vez, com o par de *primers* C_2 cujo alvo é *TxΔ*, esta sequência é amplificada sendo visível uma banda de 1 Kb correspondente ao fragmento *TxΔ*. Para a estirpe parental controlo negativo de genótipo *Tx* com o par de *primers* C_1 é visível uma banda de 250 pb correspondente ao fragmento do gene alvo *Tx* amplificado. Já com o par de *primers* C_2 não há banda, pois o alvo destes *primers* é *TxΔ* e portanto não há amplificação, pois o gene *Tx* não está deletado. Por comparação com estes controlos, confirma-se o genótipo *TxΔ* para os candidatos yRP7#1, yRP7#2 e yRP7#3.

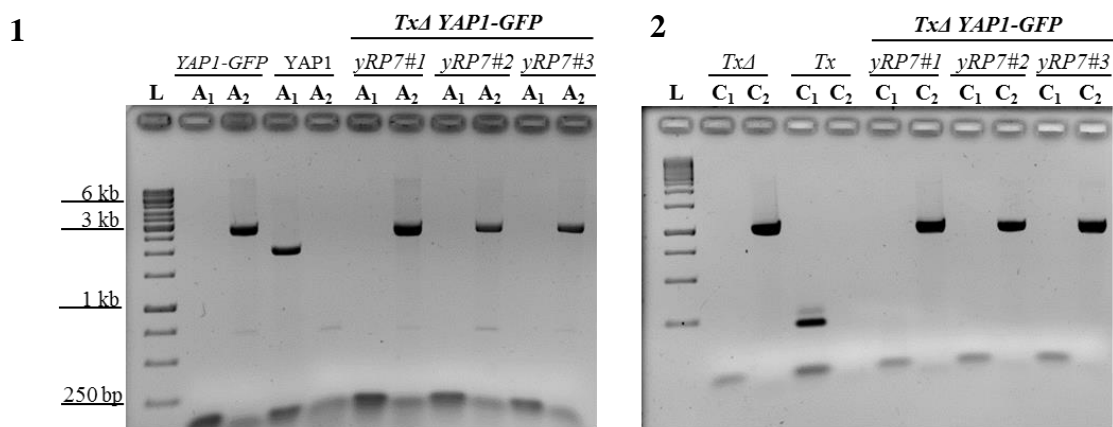


Figura 4.5 – Eletroforese em géis de agarose (1,5%) em TBE 0,5x com os resultados PCR. **1** - Confirmação do genótipo *A-GFP* para os haploides *TxΔ YAPI-GFP*; **2** - Confirmação do genótipo *TΔ* para os haploides *TxΔ YAPI-GFP*. **L** – Marcador *GeneRuler*TM 1 Kb ADN (0,1 µg/µL). *Primers* usados (Tabela 3.3): A_1 , A_2 , C_1 , C_2 .

Pela mesma análise seguem-se os resultados para os restantes cruzamentos (Figura 4.6 e Figura 4.7).

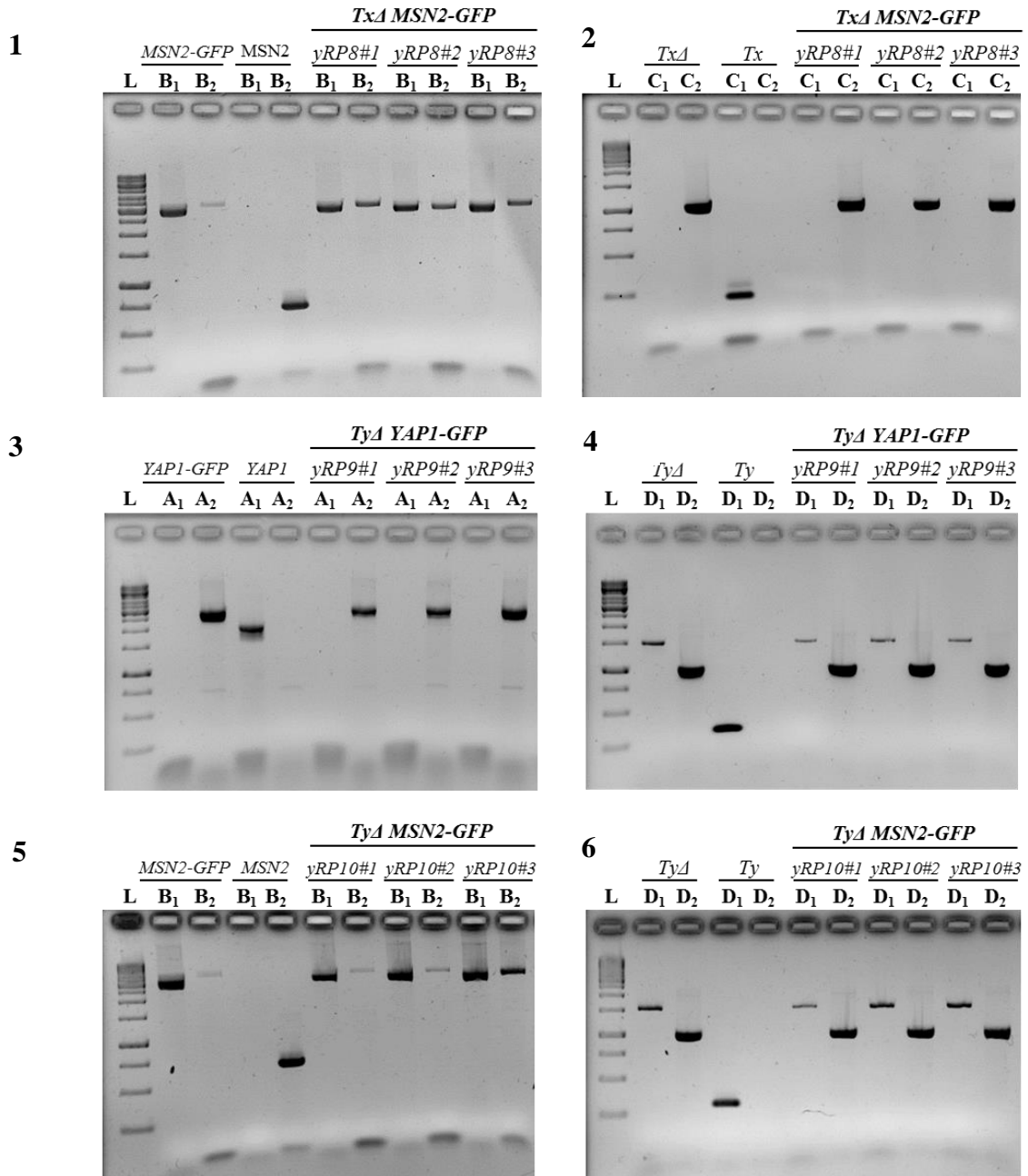


Figura 4.6 - Eletroforese em géis de agarose (1,5%) em TBE 0,5x com os resultados PCR. **1,3 e 5** - Confirmação do genótipo *A-GFP* para os haploides *TxA MSN2-GFP*, *TyΔ YAPI-GFP* e *TyΔ MSN2-GFP*, respetivamente. **2,4 e 6** - Confirmação do genótipo *TΔ* para os haploides *TxA MSN2-GFP*, *TyΔ YAPI-GFP* e *TyΔ MSN2-GFP*, respetivamente. **L** – Marcador *GeneRuler*TM 1 Kb ADN (0,1 µg/µL). *Primers* usados (Tabela 3.3): A₁, A₂, B₁, B₂, C₁, C₂, D₁, D₂.

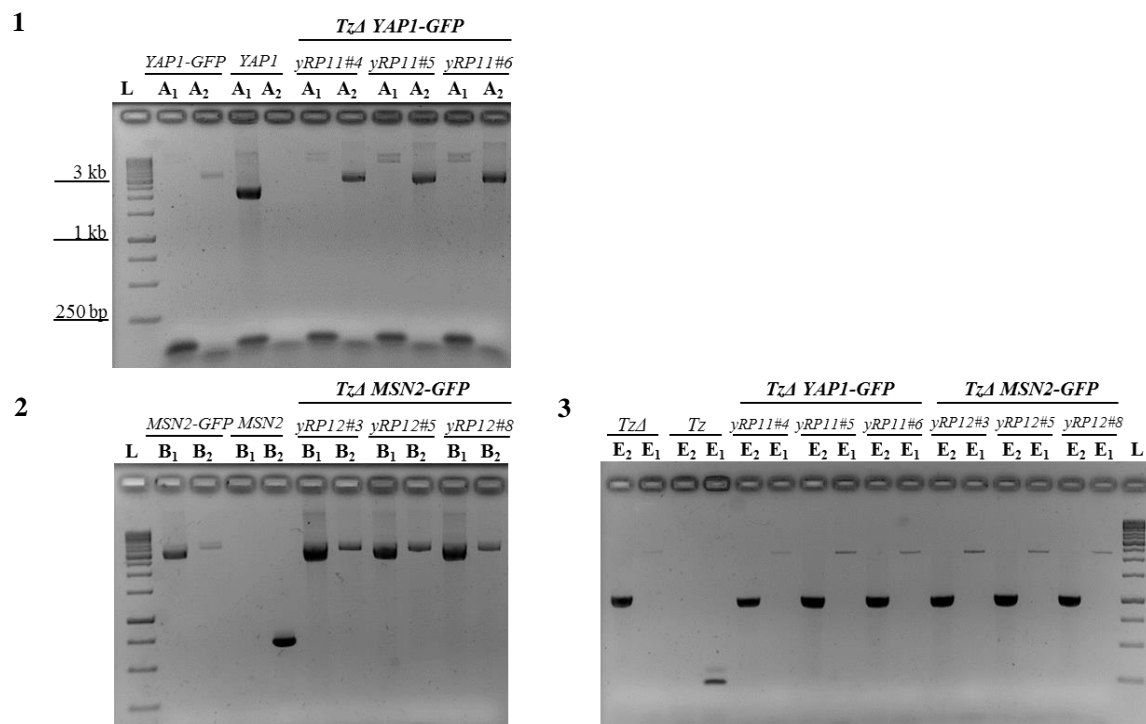


Figura 4.7 – Eletroforese em géis de agarose (1,5%) em TBE 0,5x com os resultados PCR. **1 e 2** - Confirmação do genótipo *A-GFP* para os haploides *TzΔ YAPI-GFP* e *TzΔ MSN2-GFP*, respetivamente. **3** - Confirmação do genótipo *TΔ* para os haploides *TzΔ YAPI-GFP* e *TzΔ MSN2-GFP*. **L** – Marcador *GeneRuler™* 1 Kb ADN (0,1 µg/µL). *Primers* usados (Tabela 3.3): A₁, A₂, B₁, B₂, E₁, E₂.

4.3 Caracterização e análise comparativa do crescimento celular

Os 18 haploides escolhidos, três de cada um dos seis cruzamentos, selecionados fenotipicamente e confirmados genotipicamente foram caracterizados ao nível do seu crescimento celular. Tal como descrito no capítulo 3, alínea 3.5 foram realizadas curvas de crescimento das estirpes haploides construídas e das estirpes parentais *A-GFP* como controlo positivo desta análise. O objetivo é avaliar o crescimento das estirpes construídas comparando com as estirpes parentais, pretendendo-se confirmar se estas têm um comportamento semelhante, validando assim o uso destas estirpes haploides para a realização de curvas de crescimento com tratamento com o H₂O₂ ou outras drogas, e tratamentos combinados, que permitem o estudo do efeito das drogas no crescimento celular das estirpes [7]. Como se pode observar pelos gráficos da Figura 4.8, os candidatos revelaram uma proliferação semelhante aos respetivos controlos durante 24 horas. Algumas diferenças visíveis no início da fase estacionária pode ser explicado pelo facto

das estirpes parentais *A-GFP* serem *MAT α* e os haploides que se diferenciam poderem ser *MAT α* .

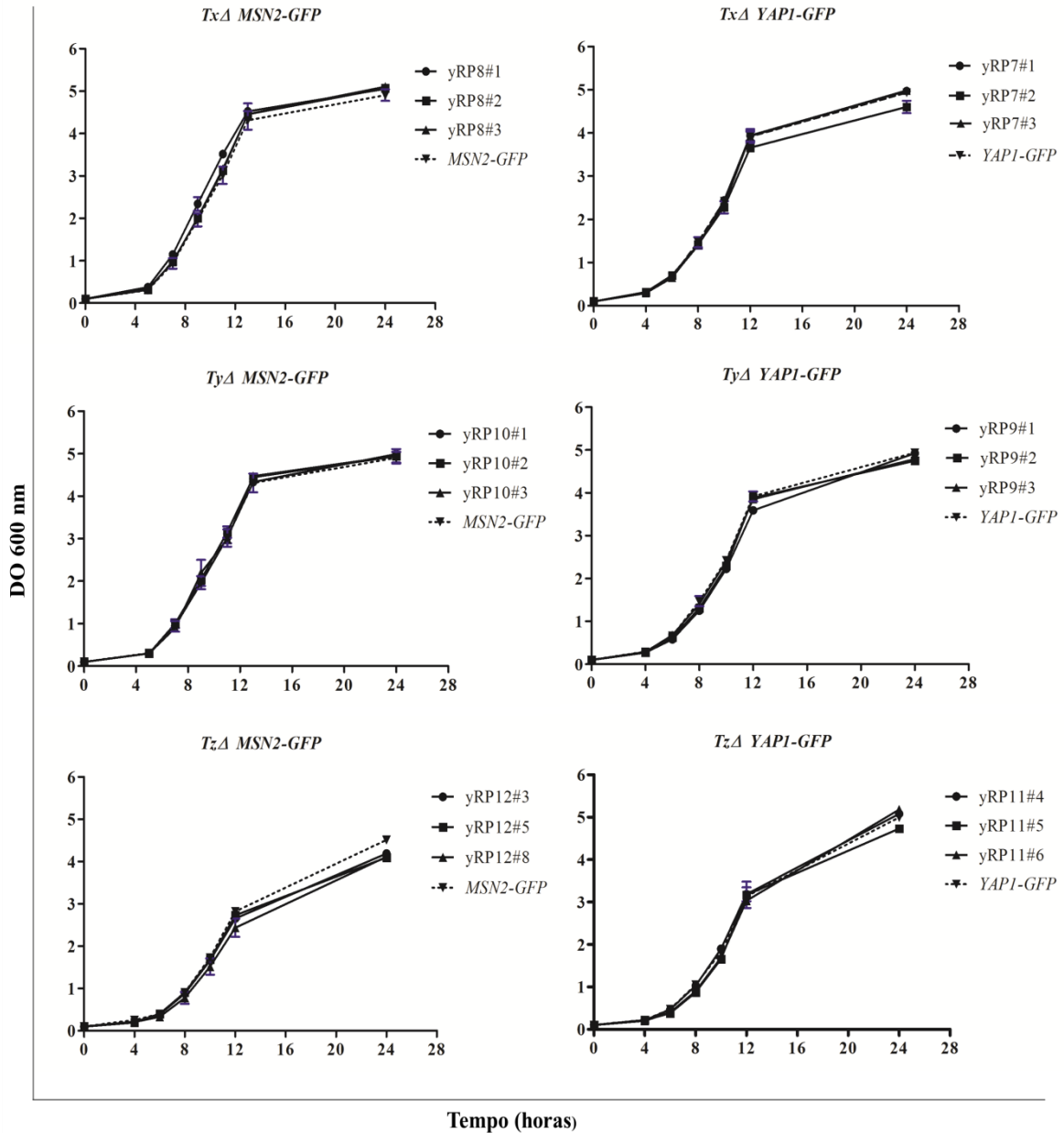


Figura 4.8 – Gráficos da DO a 600 nm em função do tempo em horas para cada um dos três haploides de cada cruzamento *TA A-GFP*. A DO foi medida periodicamente durante 24 horas a partir de suspensões celulares em meio SC líquido completo.

4.4 Validação das estirpes haploides construídas e determinação da sensibilidade ao H₂O₂ por microscopia de fluorescência

Por último, as estirpes haploides foram sujeitas a um tratamento com H₂O₂, fixadas com formaldeído e observadas no microscópio de fluorescência em meio de montagem com DABCO e glicerol como descrito no capítulo 3, alínea 3.6. O procedimento de tratamento e fixação das células foi executado em dias diferentes para cada um dos transportadores (*TA*). Foi possível verificar como estas estirpes reagem ao H₂O₂ a 0,25 mM. Observou-se as células com localização nuclear com o filtro para a Gfp, significando que nestas condições com este tratamento de 10 minutos, os fatores de transcrição Yap1 e Msn2 em fusão com a Gfp localizam-se no núcleo das células. Posteriormente foi repetida a montagem, a observação e aquisição de imagens destes mesmos haploides no microscópio de fluorescência, desta vez adicionando às células já fixadas e armazenadas a 4°C o corante fluorescente DAPI, de modo a localizar o núcleo e confirmar assim a localização do sinal nuclear da Gfp.

Foi realizado um ensaio independente por cruzamento, tendo sido visualizadas em média 200 células por tratamento em cada cruzamento (*TA A-GFP*). Pela análise dos gráficos de barras (Figura 4.9), verifica-se que a percentagem de células com localização nuclear quando sujeitas ao tratamento com H₂O₂ é maior nos haploides *TA YAP1-GFP* do que nos haploides *TA MSN2-GFP*, resultados confirmados também na primeira aquisição de fotos (Figura 7.1 dos anexos). Estes resultados podem ser explicados pelo facto do fator de transcrição Msn2, apesar de ativar a transcrição genética nestas condições de stresse provocadas pelo H₂O₂, é mais ativo em condições de stresse osmótico ou térmico, enquanto o fator de transcrição Yap1 é mais específico na resposta ao stresse oxidativo, permanecendo no núcleo para ativar a transcrição de determinados genes [2]. Este facto explica também a percentagem de células com localização nuclear sem tratamento nos cruzamentos *TA MSN2-GFP*.

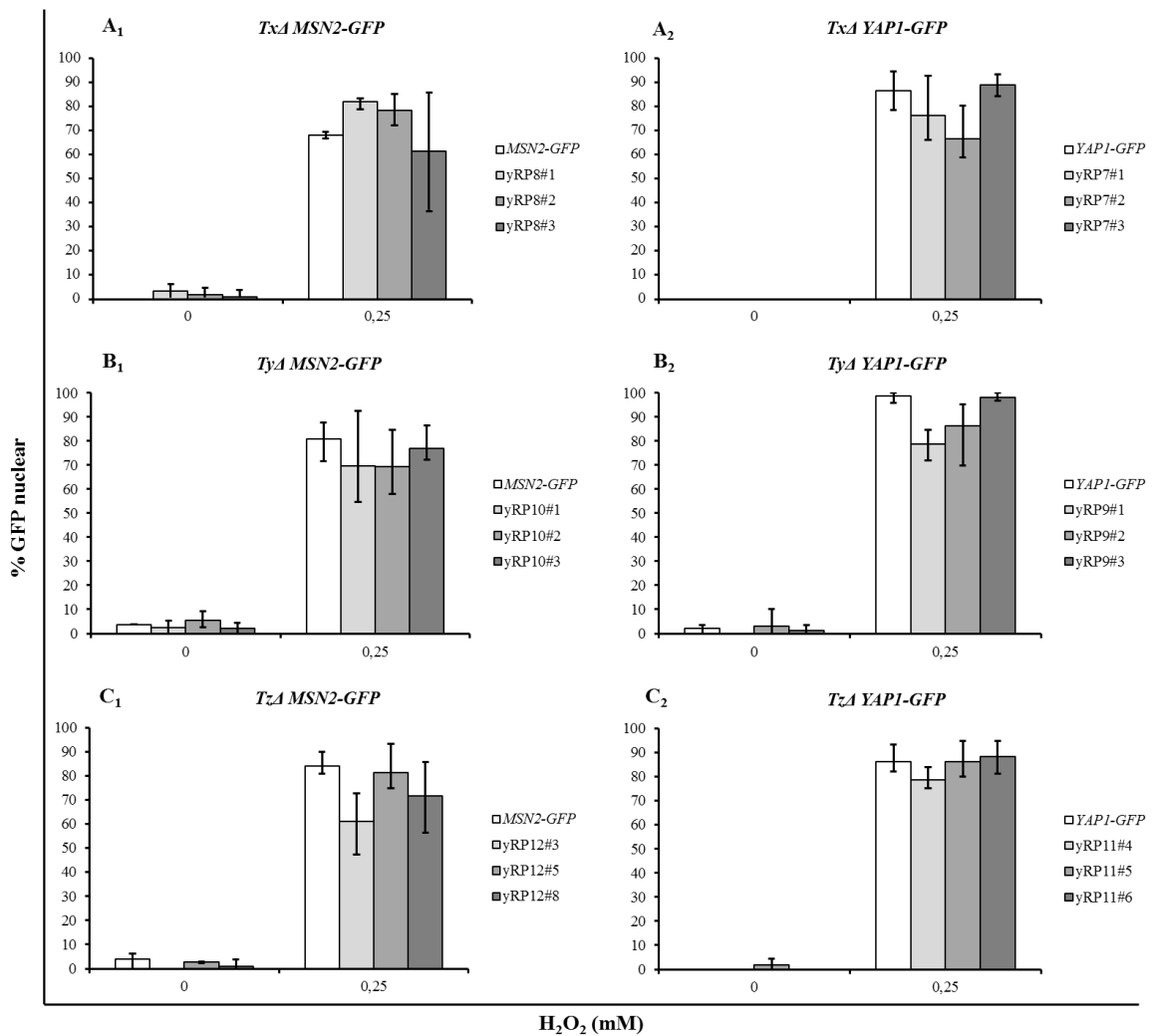


Figura 4.9 – Gráficos de barras da média da percentagem (%) de células com localização nuclear, sem tratamento e com tratamento com 0,25 mM de H₂O₂. A₁, B₁ e C₁ representam os haploides (*TA MSN2-GFP*) respetivamente. A₂, B₂ e C₂ representam cada dos haploides (*TA YAPI-GFP*) respetivamente. Resultados provenientes da 2^a aquisição de imagens por microscopia de fluorescência. As barras erros apresentam o máximo e o mínimo.

Existem diferenças entre os controlos *MSN2-GFP* e *YAPI-GFP* realizados nos diferentes dias, idealmente seria fazer mais ensaios independentes por cruzamento. Apesar de se ter realizado apenas um ensaio independente por cruzamento, existem três haploides para cada um dos cruzamentos que foram avaliados relativamente à sua sensibilidade ao tratamento. Deste modo, é possível escolher um dos três haploides que tenha maior proximidade com o respetivo controlo (*A-GFP*), para posteriores ensaios de sobrevivência e/ou curvas de crescimento com outras drogas. Já que foi possível através deste ensaio de microscopia não só confirmar o genótipo pretendido para os haploides construídos, como também analisar o

comportamento destas estirpes haploides relativamente às respectivas estirpes parentais. Verificou-se que nenhuma estirpe se destaca com maior sensibilidade ao H_2O_2 , tendo resultados semelhantes não só entre os haploides com o mesmo genótipo, como entre haploides com diferentes transportadores deletados e principalmente comparativamente com as estirpes parentais, podendo assim validar estas estirpes para testar outras drogas insolúveis em água.

Foram selecionadas imagens representativas (Figura 4.10, Figura 4.11 e Figura 4.12) de todas aquelas adquiridas por microscopia de fluorescência para cada um dos 18 haploides escolhidos dos seis cruzamentos e para os respectivos haploides parentais (*A-GFP*), para uma análise de resultados comparativa. É visível a diferença evidente das células dos haploides com localização nuclear quando sujeitos ao tratamento de H_2O_2 a 0,25 mM e das mesmas sem o tratamento, bem como a confirmação da localização do núcleo observada com o filtro para o DAPI, demonstrando que a proteína Gfp se localiza no núcleo quando despoletadas as condições de stresse oxidativo pela ação do H_2O_2 a 0,25 mM.

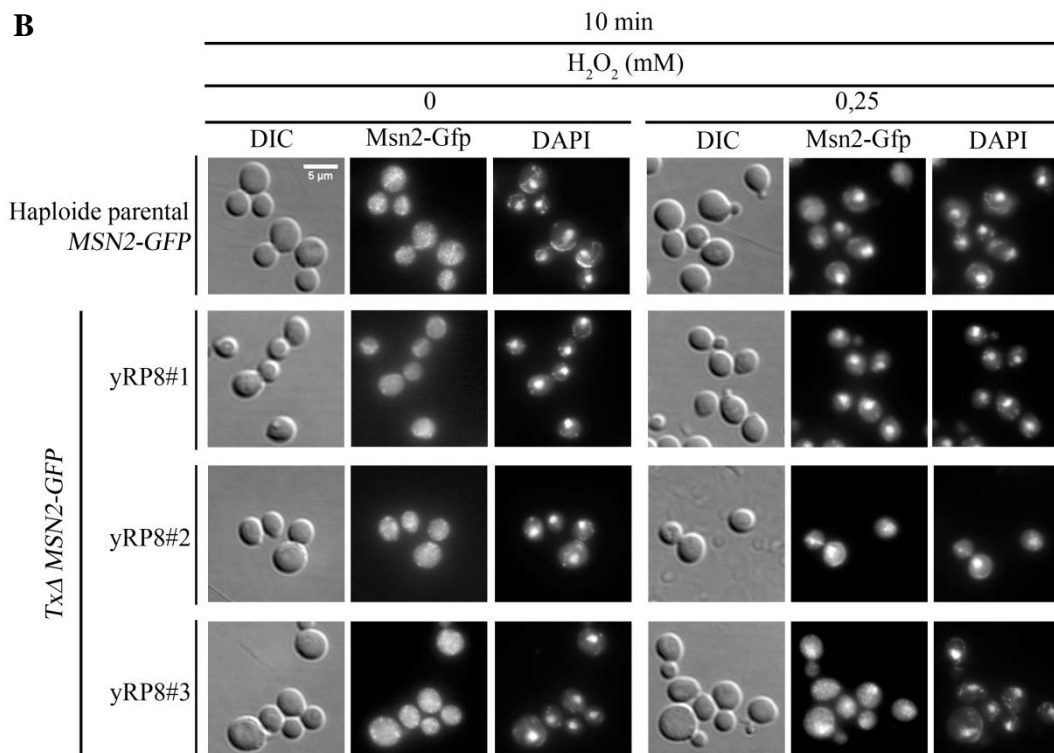
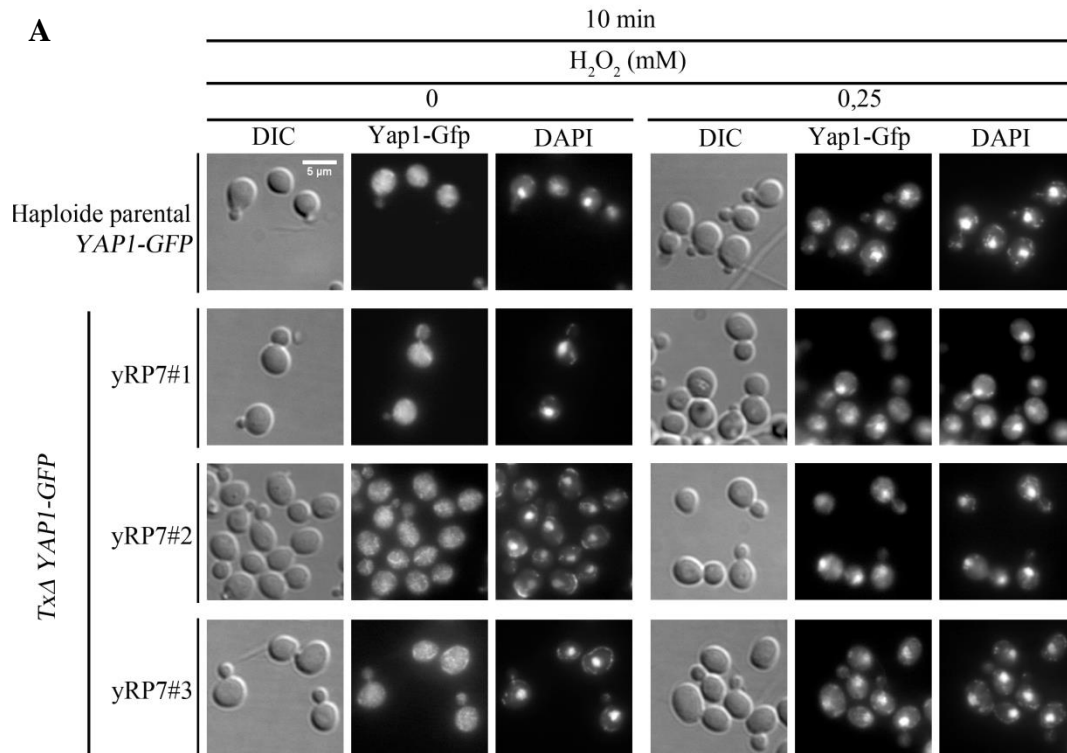


Figura 4.10 – Imagens dos haploides de *S. cerevisiae* adquiridas no microscópio de fluorescência Leica DM 5500 B com o filtro DIC com 250 ms de exposição, filtro para a Gfp com 2500 ms de exposição e filtro para o DAPI com 600 ms de exposição. A - Haploides com genótipo *TxΔ YAP1-GFP*; B – Haploides com genótipo *TxΔ MSN2-GFP*.

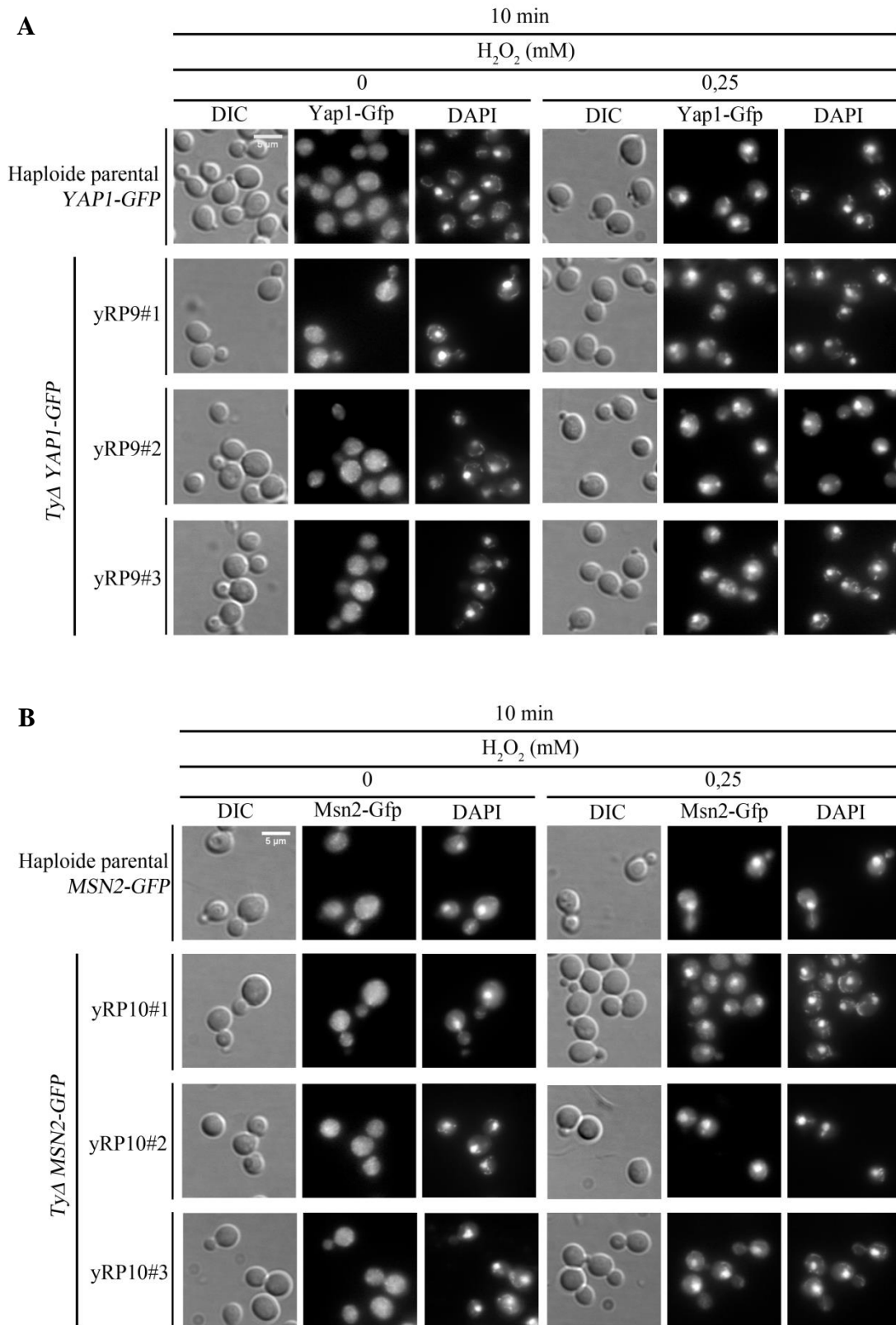


Figura 4.11 - Imagens dos haploides de *S. cerevisiae* adquiridas no microscópio de fluorescência Leica DM 5500 B com o filtro DIC com 250 ms de exposição, filtro para a Gfp com 2500 ms de exposição e filtro para o DAPI com 600 ms de exposição. A - Haploides com genótipo *TyΔ YAPI-GFP*; B - Haploides com genótipo *TyΔ MSN2-GFP*.

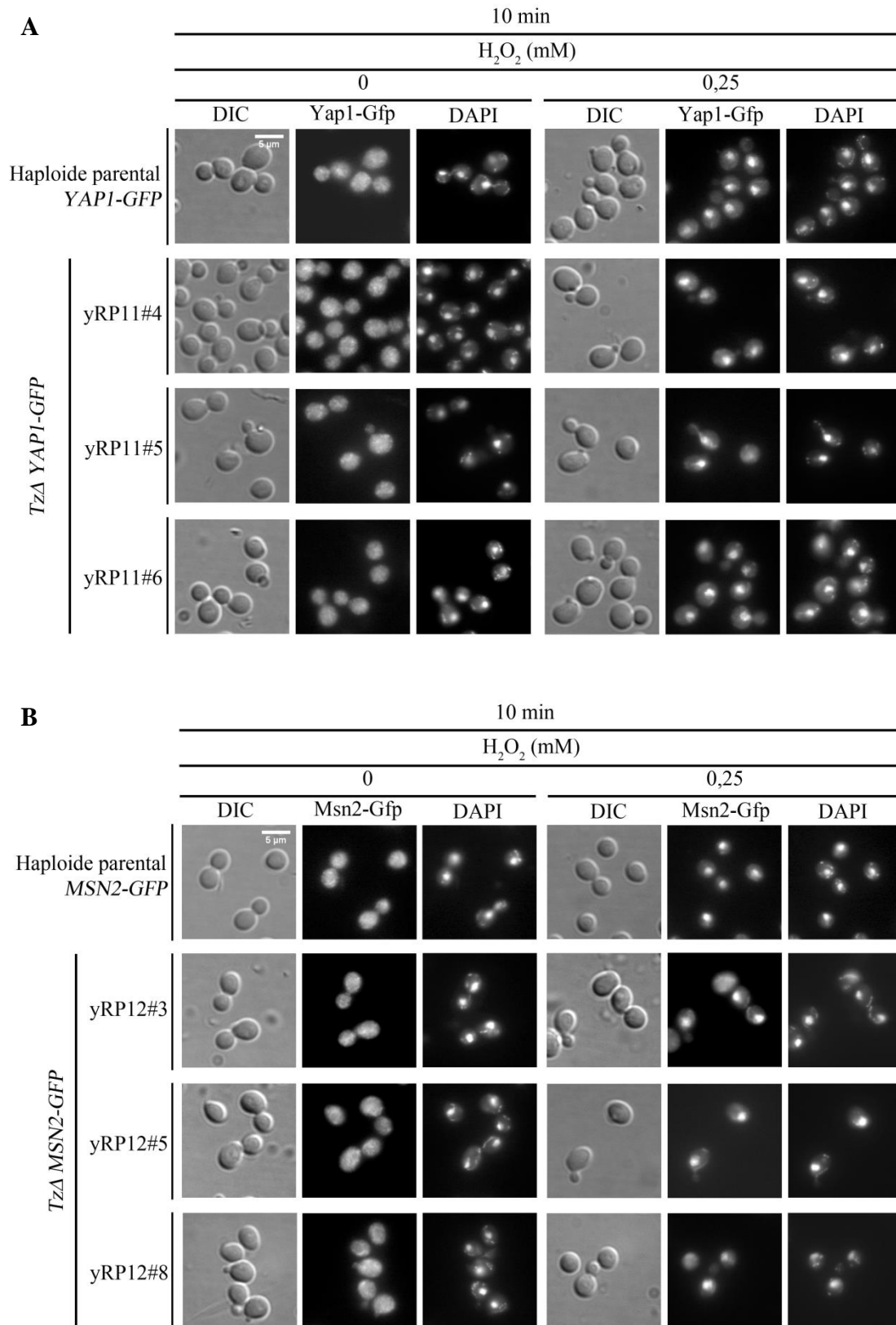


Figura 4.12 – Imagens dos haploides de *S. cerevisiae* adquiridas no microscópio de fluorescência Leica DM 5500 B com o filtro DIC com 250 ms de exposição, filtro para a Gfp com 2500 ms de exposição e filtro para o DAPI com 600 ms de exposição. A - Haploides com genótipo *TzΔ YAP1-GFP*; B – Haploides com genótipo *TzΔ MSN2-GFP*.

5. CONCLUSÃO

Foi implementada e otimizada uma metodologia para a construção de estirpes haploides de *S. cerevisiae* com genótipo específico para permitir a acumulação de drogas e potenciar as condições que desencadeiam a ação dos ativadores Msn2 e Yap1. Esta metodologia envolveu o estudo e aplicação ajustada da conjugação das estirpes parentais, da esporulação, da libertação dos esporos por tratamento enzimático e respetiva seleção, da análise e caracterização das estirpes ao nível do fenótipo, do genótipo, da proliferação celular e validação por microscopia de fluorescência.

Neste contexto, foram obtidas novas estirpes de *S. cerevisiae* cujo genótipo foi confirmado fenotipicamente e genotipicamente por análise de PCR e confirmação por microscopia de fluorescência, validando as estirpes construídas quando sujeitas ao tratamento modelo com H₂O₂ em comparação com as estirpes parentais *A-GFP* como ferramenta para a caracterização de propriedades antioxidantes e/ou pró-oxidantes de drogas ao nível do stresse oxidativo em *S. cerevisiae*. Esta ferramenta, uma vez válida em resposta ao H₂O₂, torna-se apta para testar outros compostos, permitindo a melhoria da exposição das células a drogas, mesmo que estas sejam insolúveis em água ou em outros solventes orgânicos hidrofílicos como o DMSO e facilitando assim a análise dos respetivos efeitos. As três estirpes haploides construídas para cada um dos cruzamentos revelaram comportamentos semelhantes ao nível da sua proliferação como também da sua sensibilidade quando expostas ao H₂O₂, o que valida o respetivo genótipo apesar de não ter sido realizado três ensaios independentes.

Deste modo, o trabalho realizado valida a utilização das estirpes construídas para testar e averiguar o efeito de drogas ao nível do stresse oxidativo, comparativamente com o tratamento modelo com H₂O₂ analisado. Tornando as estirpes viáveis como modelo celular simples e relativamente económico, para prosseguir com ensaios de sobrevivência, análise da proliferação celular e monitorização da proteína Gfp por microscopia fluorescência com diferentes tratamentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costa, V. and P. Moradas-Ferreira, *Oxidative stress and signal transduction in Saccharomyces cerevisiae: insights into ageing, apoptosis and diseases*. Molecular Aspects of Medicine, 2001. **22**(4–5): p. 217-246.
2. Kevin A. Morano, Chris M. Grant, and W.S. Moye-Rowley, *The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2012. **190**: p. 1157–1195.
3. Pletschi, M., *Compostos naturais biologicamente ativos*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 1998: p. 12-15.
4. Hoult, J.R.S. and M. Paya, *Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential*. General Pharmacology, 1996. **27**(4): p. 713-722.
5. Kawabata, Y., et al., *Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **420**(1): p. 1-10.
6. Khadka, P., et al., *Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014.
7. Pinto, D.S.A., *Avaliação do potencial antifúngico de coumarinas e lapachol em Saccharomyces cerevisiae*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2013. p. 41.
8. Igual, J.C. and F. Estruch, *Signalling Stress in Yeast*. Yeast, Food technol. biotechnol, 2000. **38**(4): p. 263-276.
9. Toone, W.M. and N. Jones, *Stress-activated signalling pathways in yeast*. Genes to Cells, 1998. **3**(8): p. 485-498.
10. Goffeau A, et al., *Life with 6000 genes*. Science, 1996. **274**: p. 546-567.
11. Mojca Mattiazzi, U.P., Igor Križaj *Yeast as a model eukaryote in toxinology: A functional genomics approach to studying the molecular basis of action of pharmacologically active molecules*. Toxicon, 2012. **60**: p. 558–571.
12. David Botstein, Steven A. Chervitz, and J.M. Cherry, *Yeast as a Model Organism*. Science, 1997. **277**: p. 1259-1260.
13. Sherman, F., *Getting started with yeast*. Methods Enzymology, 2002. **350**: p. 3-41.
14. Nielsen, J., *Systems biology of lipid metabolism: From yeast to human*. Febs Letters, 2009. **583**(24): p. 3905-3913.

15. Herrero, E., et al., *Redox control and oxidative stress in yeast cells*. Biochimica et Biophysica Acta, 2008. **1780**: p. 1217-1235.
16. Forsburg, S.L., *The art and design of genetic screens: yeast*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(9): p. 659-668.
17. Scherens, B. and A. Goffeau, *The uses of genome-wide yeast mutant collections*. Genome Biology, 2004. **5**(7).
18. Lushchak, V.I., *Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals*. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, 2011. **153**(2): p. 175-190.
19. Rodrigues, F., P. Ludovico, and C. Leão, *Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism*, em *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Editor G. Péter and C. Rosa. Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 101-121.
20. Saeidnia, S. and M. Abdollahi, *Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2013. **273**(3): p. 442-455.
21. Rowe, L.A., N. Degtyareva, and P.W. Doetsch, *DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in Saccharomyces cerevisiae*. Free Radical Biology and Medicine, 2008. **45**(8): p. 1167-1177.
22. Veal, E.A., A.M. Day, and B.A. Morgan, *Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling*. Molecular Cell, 2007. **26**(1): p. 1-14.
23. Christian Godon, et al., *The H₂O₂ Stimulon in Saccharomyces cerevisiae*. Biological Chemistry, 1998. **273**: p. 2480–22489.
24. Yan, C., L.H. Lee, and L.I. Davis, *Crmlp mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor*. Embo Journal, 1998. **17**(24): p. 7416-7429.
25. Kuge, S., N. Jones, and A. Nomoto, *Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress*. Embo Journal, 1997. **16**(7): p. 1710-1720.
26. Wolfram Goner, et al., *Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity*. Genes & Development, 1998. **12**: p. 586-597.
27. Wolfram Goner, et al., *Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity*. Genes & Development, 1998. **12**: p. 586-597
28. Van Belle, D. and B. Andre, *A genomic view of yeast membrane transporters*. Current Opinion in Cell Biology, 2001. **13**(4): p. 389-398.

29. Jungwirth, H., et al., *Diazaborine resistance in yeast involves the efflux pumps Ycf1p and Flr1p and is enhanced by a gain-of-function allele of gene YAP1*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(15): p. 4809-4816.
30. Higgins, C.F., *ABC Transporters: From Microorganisms to Man*. Cell Biology, 1992. **8**: p. 67-113.
31. K., L., *Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme*. Trends in Biochemical Sciences, 1994. **19**(3): p. 119-23.
32. Taglicht, D. and S. Michaelis, *Saccharomyces cerevisiae ABC proteins and their relevance to human health and disease*, em *Methods in Enzymology*. Editor M.M.G. Suresh V. Ambudkar. Academic Press, 1998. p. 130-162.
33. Jungwirth, H. and K. Kuchler, *Yeast ABC transporters - A tale of sex, stress, drugs and aging*. Febs Letters, 2006. **580**(4): p. 1131-1138.
34. Del Sorbo, G., H.J. Schoonbeek, and M.A. De Waard, *Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides*. Fungal Genetics and Biology, 2000. **30**(1): p. 1-15.
35. Borges Bubols, G., et al., *The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids*. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2013. **13**(3): p. 318-334.
36. Halliwell, B., *Biochemistry of oxidative stress*. Biochemical Society Transactions, 2007. **35**: p. 1147-1150.
37. Caroch, M. and I.C.F.R. Ferreira, *A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives*. Food and Chemical Toxicology, 2013. **51**: p. 15-25.
38. Pietta, P.-G., *Flavonoids as Antioxidants*. Journal of Natural Products, 2000. **63**(7): p. 1035-1042.
39. José C. R. Velloso, Vanessa de F. Barbosa, and O.M.M.d.F. Oliveira, *Pesquisa de produtos naturais: Plantas e radicais livres*. Revista eletrônica de farmácia, 2007. **4** (2): p. 119-130.
40. Isabel Ferreira and R. Abreu, *Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos*. Bioanálise, 2007. **4**(2): p. 32-39.
41. Paya, M., et al., *Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins*. Biochemical Pharmacology, 1994. **48**(3): p. 445-451.
42. Charles D. Puglia and S.R. Powell, *Inhibition of Cellular Antioxidants: A Possible Mechanism of Toxic Cell Injury*. Environmental Health Perspectives, 1984. **57**: p. 307-311.

43. Estela Guardado Yordi, et al., *Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence*, in *Nutrition, Well-Being and Health*. Editor D.J. Bouayed. InTech, 2012.
44. Haber, J.E., *Mating-Type Genes and MAT Switching in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2012. **191**: p. 33-64.
45. Wach, A., et al., *New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1994. **10**: p. 1793-1808.
46. Looke, M., K. Kristjuhan, and A. Kristjuhan, *Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications*. Biotechniques, 2011. **50**(5): p. 325-8.
47. Treco, D.A. and F. Winston, *Growth and Manipulation of Yeast*, in *Current protocols in molecular biology*. Editor I. John Wiley & Sons. 2008.
48. Hopper, A.K. and B.D. Hall, *Mating Type and Sporulation in Yeast I. Mutations Which Alter Mating-Type Control over Sporulation*. Genetics, 1975. **80**(1): p. 41-59.
49. Werner-Washburne, M., et al., *Stationary phase in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 1996. **19**(6): p. 1159-66.
50. Rooban Thavarajah, et al., *Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation*. J Oral Maxillofac Pathol, 2012. **16**(3): p. 400-405.
51. Fox, C.H., et al., *Formaldehyde fixation*. J Histochem Cytochem, 1985. **33**(8): p. 845-53.
52. Billinton, N. and A.W. Knight, *Seeing the Wood through the Trees: A Review of Techniques for Distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence*. Analytical Biochemistry, 2001. **291**(2): p. 175-197.
53. W.Bergman, L., *Growth and Maintenance of Yeast*, in *Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols*. Editor P.N. MacDonald. Human Press Inc, 2001.

7. ANEXOS

Tabela 7.1 - Meios usados com composição detalhada.

MEIOS DE CULTURA	
YPD líquido	Extrato de levedura 1%; Peptona 2%; Glucose 2%.
YPD sólido	BactoAgar 1%; Extrato de levedura 1%; Peptona 2%; Glucose 2%.
SC completo	Glucose 2%; YNB 6,85%; SC mix: L- α -Arginina 0,05%; L- α -Metionina 0,05%; L- α -Tirosina 0,075%; L- α -Isoleucina 0,075%; L- α -Lisina 0,075%; L- α -Fenilalanina 0,125%; L- α -Ácido Glutâmico 0,25%; L- α -Valina 0,375%; L- α -Ácido Aspártico 0,25%; Adenina 0,025%; Uracilo 0,025%; L- α -Tryptofano 0,05%; L- α -Leucina 0,1%; L- α -Serina 0,4%; L- α -Histidina 0,1%; L- α -Treonina 0,2%.
MEIOS DE CULTURA SELETIVOS	
SC-Lys-Met	Glucose 2%; YNB 6,85%; SC mix -Lys-Met: L- α -Arginina 0,05%; L- α -Tirosina 0,075%; L- α -Isoleucina 0,075%; L- α -Fenilalanina 0,125%; L- α -Ácido Glutâmico 0,25%; L- α -Valina 0,375%; L- α -Ácido Aspártico 0,25%; Adenina 0,025%; Uracilo 0,025%; L- α -Tryptofano 0,05%; L- α -Leucina 0,1%; L- α -Serina 0,4%; L- α -Histidina 0,1%; L- α -Treonina 0,2%.
SC-Lys	Glucose 2%; YNB 6,85%; SC mix -Lys-Met: L- α -Arginina 0,05%; L- α -Tirosina 0,075%; L- α -Isoleucina 0,075%; L- α -Fenilalanina 0,125%; L- α -Ácido Glutâmico 0,25%; L- α -Valina 0,375%; L- α -Ácido Aspártico 0,25%; Adenina 0,025%; Uracilo 0,025%; L- α -Tryptofano 0,05%; L- α -Leucina 0,1%; L- α -Serina 0,4%; L- α -Histidina 0,1%; L- α -Treonina 0,2%; L- α -Metionina 0,05%.
SC-Met	Glucose 2%; YNB 6,85%; SC mix -Lys-Met: L- α -Arginina 0,05%; L- α -Tirosina 0,075%; L- α -Isoleucina 0,075%; L- α -Fenilalanina 0,125%; L- α -Ácido Glutâmico 0,25%; L- α -Valina 0,375%; L- α -Ácido Aspártico 0,25%; Adenina 0,025%; Uracilo 0,025%; L- α -Tryptofano 0,05%; L- α -Leucina 0,1%; L- α -Serina 0,4%; L- α -Histidina 0,1%; L- α -Treonina 0,2%; L- α -Lisina 0,075%.

MEIOS DE CULTURA SELETIVOS (CONTINUAÇÃO)	
SC-His	Glucose 2%; YNB 6,85%; SC mix -Lys-Met: L- α -Arginina 0,05%; L- α -Tirosina 0,075%; L- α -Isoleucina 0,075%; L- α -Fenilalanina 0,125%; L- α -Ácido Glutâmico 0,25%; L- α -Valina 0,375%; L- α -Ácido Aspártico 0,25%; Adenina 0,025%; Uracilo 0,025%; L- α -Tryptofano 0,05%; L- α -Leucina 0,1%; L- α -Serina 0,4%; L- α -Treonina 0,2%; L- α -Metionina 0,05%; L- α -Lisina 0,075%.
YPD seletivo	BactoAgar 1%; Extrato de levedura 1%; Peptona 2%; Glucose 2%; Antibiótico G418 a 0,2mg/mL.
MEIOS DE PRÉ-ESPORULAÇÃO	
Sólido	Extrato de levedura 0,8%; Peptona 0,3%; BactoAgar 2%; Glucose 10%.
YPD líquido	Extrato de levedura 1%; Peptona 2%; Glucose 2%.
MEIOS DE ESPORULAÇÃO	
Sólido	Acetato de potássio 1%; extrato de levedura 0,125%; BactoAgar 2%; glucose 0,1%; Uracilo 0,025% em NaOH 10 mM ou 5 mM para acertar pH e dissolver melhor; L- α -Histidina 0,1%; L- α -Leucina 0,1%; L- α -Lisina 0,075%; L- α -Metionina 0,05%.
Líquido	Acetato de potássio 1%; Uracilo 0,025% em NaOH 10 mM ou 5 mM para acertar pH e dissolver melhor; L- α -Histidina 0,1%; L- α -Leucina 0,1%; L- α -Lisina 0,075%; L- α -Metionina 0,05%.

Tabela 7.2 – Soluções, respetiva composição e preparação.

SOLUÇÕES	
Solução de desagregação a pH 8	Tris-HCL 10 mM; EDTA 5 mM
PBS a pH 7,2	NaCl 130 mM; KCl 2 mM; Na ₂ HPO ₄ 8 mM; KH ₂ PO ₄ 2 mM; EGTA 10 mM; MgCl ₂ 2 mM.

A solução de desagregação foi esterilizada por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. A solução de PBS por filtração.

Tabela 7.3 – Estirpes diploides construídas por cruzamento de estirpes haploides parentais, respetivos nomes e genótipo.

Estirpe	Genótipo
yRP1#1 yRP1#2 yRP1#3 yRP1#4 yRP1#5 yRP1#6 yRP1#7 yRP1#8 yRP1#9 yRP1#10 yRP1#11 yRP1#12	<i>TxΔ YAP1-GFP</i> <i>MATα/a, his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/LEU2, lys2Δ0/LYS2, ura3Δ0/URA3, TxΔ::kanMX4/Tx, met15Δ0/MET15, YAP1-GFP_his3MX6/YAP1</i>
yRP2#1 yRP2#2 yRP2#3 yRP2#4 yRP2#5 yRP2#6 yRP2#7 yRP2#8 yRP2#9 yRP2#10 yRP2#11 yRP2#12	<i>TxΔ MSN2-GFP</i> <i>MATα/a, his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/LEU2, lys2Δ0/LYS2, ura3Δ0/URA3, TxΔ::kanMX4/Tx, met15Δ0/MET15, MSN2-GFP_his3MX6/MSN2</i>
yRP3#1 yRP3#2 yRP3#3 yRP3#4 yRP3#5 yRP3#6 yRP3#7 yRP3#8 yRP3#9 yRP3#10 yRP3#11 yRP3#12	<i>TyΔ YAP1-GFP</i> <i>MATα/a, his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/LEU2, lys2Δ0/LYS2, ura3Δ0/URA3, TyΔ::kanMX4/Ty, met15Δ0/MET15, YAP1-GFP_his3MX6/YAP1</i>

Estirpe	Genótipo (continuação)
yRP4#1 yRP4#2 yRP4#3 yRP4#4 yRP4#5 yRP4#6 yRP4#7 yRP4#8 yRP4#9 yRP4#10 yRP4#11 yRP4#12	<i>TyΔ MSN2-GFP</i> <i>MATα/a, his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/LEU2, lys2Δ0/LYS2, ura3Δ0/URA3, TyΔ::kanMX4/Ty, met15Δ0/MET15, MSN2-GFP_his3MX6/MSN2</i>
yRP5#1 yRP5#2 yRP5#3 yRP5#4 yRP5#5 yRP5#6 yRP5#7 yRP5#8 yRP5#9 yRP5#10 yRP5#11 yRP5#12	<i>TzΔ YAP1-GFP</i> <i>MATα/a, his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/LEU2, lys2Δ0/LYS2, ura3Δ0/URA3, TzΔ::kanMX4/Tz, met15Δ0/MET15, YAP1-GFP_his3MX6/YAP1</i>
yRP6#1 yRP6#2 yRP6#3 yRP6#4 yRP6#5 yRP6#6 yRP6#7 yRP6#8 yRP6#9 yRP6#10 yRP6#11 yRP6#12	<i>TzΔ MSN2-GFP</i> <i>MATα/a, his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/LEU2, lys2Δ0/LYS2, ura3Δ0/URA3, TzΔ::kanMX4/Tz, met15Δ0/MET15, MSN2-GFP_his3MX6/MSN2</i>

Tabela 7.4 - Estirpes haploides construídas por esporulação das estirpes diploides, respetivos nomes, diploide original, número da esporulação e genótipo.

Estirpe	Diploide original	Nº Esporulação	Genótipo							
yRP7#1	yRP1#3	2ª	TxΔ YAP1-GFP	<i>MATα</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TxΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>YAP1-GFP_His3MX6</i>						
yRP7#2										
yRP7#3										
yRP7#4										
yRP7#5										
yRP7#6										
yRP7#7										
yRP7#8										
yRP7#9										
yRP7#10										
yRP7#11										
yRP7#12										
yRP7#13										
yRP7#14	yRP1#4	2ª	TxΔ YAP1-GFP	<i>MATα</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TxΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>YAP1-GFP_His3MX6</i>						
yRP7#15										
yRP7#16	yRP1#6				2ª	TxΔ YAP1-GFP	<i>MATα</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TxΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>YAP1-GFP_His3MX6</i>			
yRP7#17										
yRP7#18										
yRP7#19										
yRP7#20										
yRP7#21										
yRP7#22										
yRP7#23										
yRP8#1	yRP2#4							2ª	TxΔ MSN2-GFP	<i>MATα</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TxΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>MSN2-GFP_His3MX6</i>
yRP8#2	yRP2#6									
yRP8#3										
yRP8#4										
yRP8#5										
yRP9#1	yRP3#2	1ª	TyΔ YAP1-GFP	<i>MATα</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TyΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>YAP1-GFP_His3MX6</i>						
yRP9#2	yRP3#3									
yRP9#3	yRP3#1	3ª	TyΔ YAP1-GFP	<i>MATα</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TyΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>YAP1-GFP_His3MX6</i>						
yRP9#4										
yRP9#5										
yRP9#6										

Estirpe	Diploide original	Nº Esporulação	Genótipo (continuação)	
yRP10#1	yRP4#2	2ª	TyΔ MSN2-GFP	<i>MATα</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TyΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>MSN2-GFP_His3MX6</i>
yRP10#2				
yRP10#3				
yRP10#4				
yRP10#5	yRP4#6			
yRP11#1	yRP5#11	1ª	TzΔ YAP1-GFP	<i>MATa</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TzΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>YAP1-GFP_His3MX6</i>
yRP11#2				
yRP11#3				
yRP11#4	yRP5#1	3ª	TzΔ YAP1-GFP	<i>MATa</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TzΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>YAP1-GFP_His3MX6</i>
yRP11#5				
yRP11#6				
yRP11#7				
yRP11#8				
yRP11#9				
yRP12#1	yRP6#11	1ª	TzΔ MSN2-GFP	<i>MATα</i> ou <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>TzΔ::kanMX4</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>MSN2-GFP_His3MX6</i>
yRP12#2	yRP6#2	3ª		
yRP12#3				
yRP12#4				
yRP12#5				
yRP12#6				
yRP12#7	yRP6#3			
yRP12#8				
yRP12#9				

Tabela 7.5 – Exemplo das combinações de genótipo possíveis para os esporos obtidos na esporulação para um dos cruzamentos (*TxΔ YAPI-GFP*). O sombreado indica aqueles que se pretende selecionar.

Cruzamento <i>TxΔ YAPI-GFP</i>		
Genótipo	#	Combinações de genótipo
<i>TxΔ</i>	1	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, TxΔ::kanMX4</i>
	2	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, TxΔ::kanMX4</i>
	3	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, MET15, ura3Δ0, TxΔ::kanMX4</i>
	4	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, MET15, ura3Δ0, TxΔ::kanMX4</i>
	5	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, TxΔ::kanMX4</i>
	6	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, TxΔ::kanMX4</i>
	7	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, met15Δ0, ura3Δ0, TxΔ::kanMX4</i>
	8	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, met15Δ0, ura3Δ0, TxΔ::kanMX4</i>
<i>TxΔ YAPI-GFP</i>	9	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6, TxΔ::kanMX4</i>
	10	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6, TxΔ::kanMX4</i>
	11	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, MET15, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6, TxΔ::kanMX4</i>
	12	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, MET15, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6, TxΔ::kanMX4</i>
	13	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6, TxΔ::kanMX4</i>
	14	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6, TxΔ::kanMX4</i>
	15	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, met15Δ0, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6, TxΔ::kanMX4</i>
	16	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, met15Δ0, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6, TxΔ::kanMX4</i>
<i>Tx</i>	17	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>
	18	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>
	19	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, MET15, ura3Δ0</i>
	20	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, MET15, ura3Δ0</i>
	21	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0</i>
	22	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0</i>
	23	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, met15Δ0, ura3Δ0</i>
	24	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, met15Δ0, ura3Δ0</i>
<i>Tx YAPI-GFP</i>	25	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6</i>
	26	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6</i>
	27	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, MET15, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6</i>
	28	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, MET15, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6</i>
	29	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6</i>
	30	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6</i>
	31	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, met15Δ0, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6</i>
	32	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, met15Δ0, ura3Δ0, YAPI-GFP_his3MX6</i>

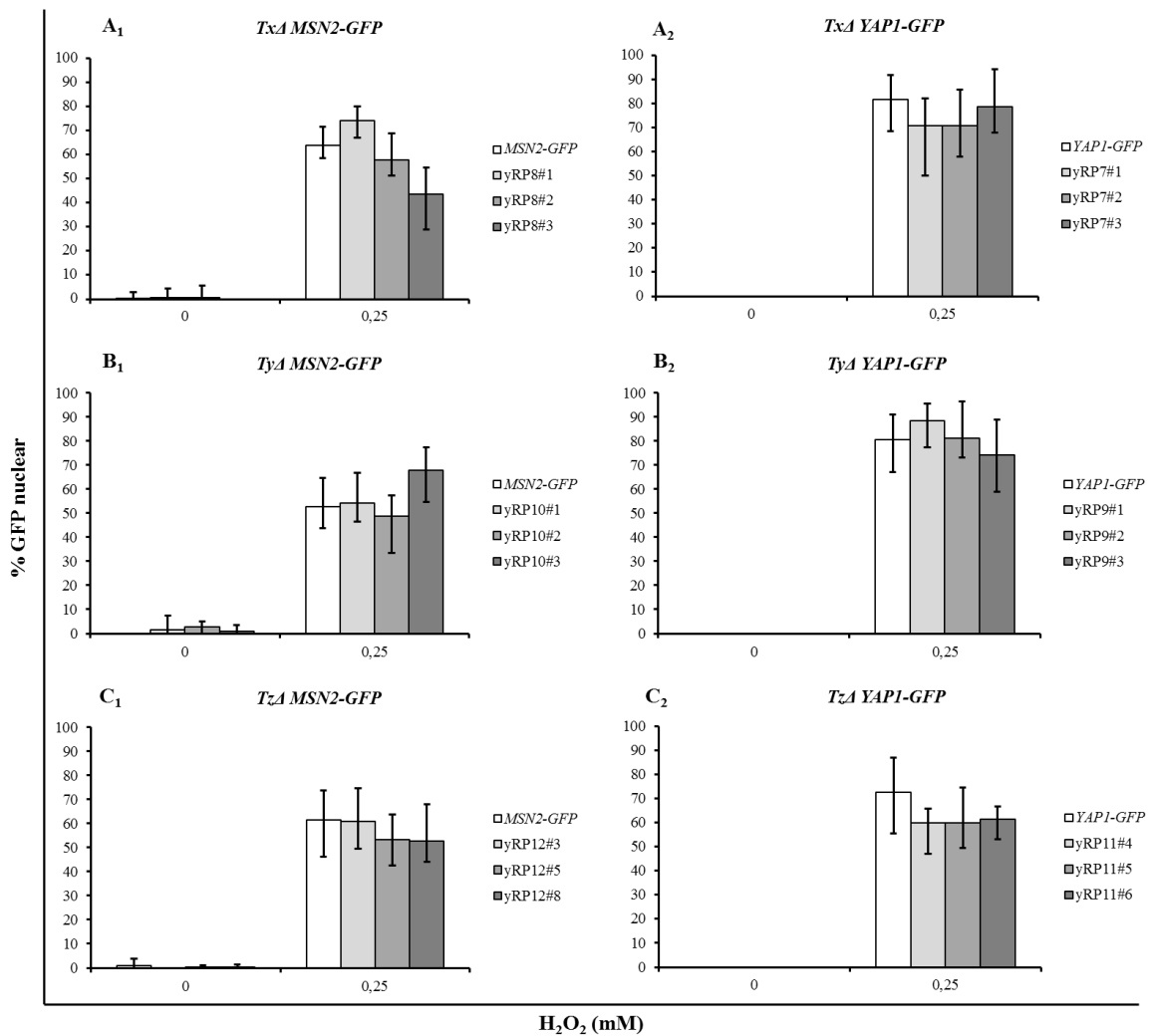


Figura 7.1 - Gráficos de barras da média da percentagem (%) de células com localização nuclear, sem tratamento e com tratamento com 0,25 mM de H₂O₂. A₁, B₁ e C₁ representam os haploides (*TA MSN2-GFP*) respetivamente. A₂, B₂ e C₂ representam cada dos haploides (*TA YAPI-GFP*) respetivamente. Resultados provenientes da 1^a aquisição de imagens por microscopia de fluorescência. As barras erros apresentam o máximo e o mínimo.