

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**EFEITO DE CURCUMINA NA MORFOLOGIA E DINÂMICA VACUOLAR EM
LEVEDURA DE FISSÃO**

DAPHNE ALVES DIAS

**CAMPOS DOS GOYTACAZES
MARÇO – 2021**

DAPHNE ALVES DIAS

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Orientadora: Prof^a Dr^a Anna L. Okorokova-Façanha
Coorientador: Prof. Dr. Arnoldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

D541 Dias, Daphne Alves.

Efeito de curcumina na morfologia e dinâmica vacuolar em levedura de fissão / Daphne Alves Dias. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

70 f. : il.

Bibliografia: 59 - 70.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientadora: Anna Lvovna Okorokova Facanha.

Coorientador: Arnaldo Rocha Façanha.

1. levedura. 2. endomembranas. 3. P5A-Atpase. 4. câncer. 5. redes de interação. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

EFEITO DE CURCUMINA NA MORFOLOGIA E DINÂMICA VACUOLAR EM
LEVEDURA DE FISSÃO

DAPHNE ALVES DIAS

“Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.”

Aprovada em 03 de março de 2021

Comissão examinadora:



Dr^a Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis (Doutora em Biotecnologia) – Instituto
GALZU



Dr^a Bruna Xavier Martins (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – UENF



Prof. Dr. João Carlos de Aquino Almeida (Doutor em Ciências Biológicas/Biofísica) –
UENF



Prof^a Dr^a Anna Lvovna Okorokova-Façanha (Doutora em Química Biológica) – UENF
(Orientadora)

Dedico este trabalho à minha mãe, que desde o início não mediu esforços para me apoiar.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui é, sem dúvidas, uma das maiores conquistas da minha vida, um sonho tão desejado por longos anos, enfim alcançado. Agradeço a Deus por guiar meus caminhos, abrir portas e sempre me colocar nos lugares certos, com pessoas certas.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Anna L. Okorokova-Façanha por ter me recebido de braços abertos, por tão ricos ensinamentos, por sempre me ajudar, orientar, inspirar, pelo empenho e, também, pela amizade e confiança. Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha por se fazer presente e por todo conhecimento compartilhado. Me sinto honrada em ser parte desse grupo e muito grata por ser tão bem acolhida.

Obrigada a todos na UENF que contribuíram de alguma forma, seja em experimentos, em companhia ou amizade. Agradeço ao Antônio, que a todo momento esteve disposto a me ajudar, pelos longos momentos em frente à bancada e ao microscópio, pelos ensinamentos, pela análise estatística para os números de vacúolos e também, pela amizade. Obrigada a Larissa Gleyce que esteve comigo em boa parte dos ensaios, meu braço direito, disposta a ajudar e a aprendermos juntas. Agradeço a todos os colegas e amigos do nosso grupo de pesquisa. Aos técnicos do LFBM e LBCT, com quem pude contar diversas vezes.

A todo corpo docente do curso de mestrado que contribuiu para minha formação, por todo conhecimento compartilhado e vivências.

O meu muito obrigada à CAPES pela bolsa concedida, aos órgãos de fomento, e também à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pelo suporte institucional. O meu muito obrigada a minha família que sempre me apoiou e ajudou incondicionalmente, estando presente mesmo na distância.

Agradeço aos meus professores do Ifes Campus de Alegre que contribuíram para minha formação profissional e pessoal e me ajudaram a chegar onde cheguei. Obrigada aos meus amigos de Rive que sempre acompanharam tudo e torceram por mim. Obrigada pelas conversas e momentos de distração.

O meu muito obrigada a todos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	<i>Levedura: organismo modelo</i>	13
1.2	<i>Curcumina (Curcuma longa L.)</i>	14
1.2.1	<i>Curcumina e seus efeitos na célula animal</i>	16
1.2.2	<i>Curcumina e seus efeitos em células de levedura</i>	17
1.2.3	<i>Curcumina e seus efeitos em ATPases</i>	18
1.3	<i>Sistemas Endomembranas</i>	19
1.3.1	<i>Retículo Endoplasmático</i>	20
1.3.2	<i>Vacúolos</i>	21
1.3.3	<i>Mitocôndrias</i>	22
1.4	<i>ATPases de Ca²⁺ e H⁺</i>	23
2	OBJETIVO	25
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	25
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	<i>Cepas microbianas utilizadas</i>	26
3.2	<i>Meios de cultura e manutenção</i>	26
3.3	<i>Avaliação do efeito da curcumina em culturas de S. pombe em meio líquido</i>	26
3.4	<i>Avaliação do efeito da curcumina em culturas de S. pombe em meio sólido</i>	27
3.5	<i>Marcação de vacúolos em células de S. pombe</i>	27
3.6	<i>Marcação de mitocôndrias em células de S. pombe</i>	28
3.7	<i>Análise estatística</i>	29
3.8	<i>Análise da expressão gênica de ATP13A1</i>	29
4	RESULTADOS	30
4.1	<i>Avaliação do efeito da curcumina no cultivo de células de S. pombe</i>	30
4.1.1	<i>Ensaio no meio líquido</i>	30
4.1.2	<i>Ensaio no meio sólido</i>	34
4.2	<i>Efeito da curcumina na organização de vacúolos em células S. pombe</i>	36
4.3	<i>Análise do efeito de curcumina em mitocôndrias de células de S. pombe</i>	43
4.4	<i>Análise da expressão de ATP13A1</i>	45
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Curcuma longa</i> L.	15
Figura 2. Curvas de crescimento de <i>S. pombe</i> na presença de curcumina.	31
Figura 3. Taxa de inibição do crescimento de culturas de <i>S. pombe</i> exposta à diferentes concentrações de curcumina.	32
Figura 4. Adição de FeSO ₄ reverte o efeito inibitório causado pela curcumina no cultivo de <i>S. pombe</i>	33
Figura 5. Efeito da curcumina e ferro no crescimento e morfologia das células de <i>S. pombe</i>	35
Figura 6. Marcação do lúmen vacuolar em células <i>wt</i> de <i>S. pombe</i> com sonda fluorescente CMAC.	36
Figura 7. Marcação do lúmen vacuolar em células <i>cta4Δ</i> de <i>S. pombe</i> com sonda fluorescente CMAC.	38
Figura 8. Marcação de vacúolos com a sonda fluorescente MDY-64 em células de <i>S. pombe</i> cultivadas na ausência e presença de curcumina	39
Figura 9. Marcação de vacúolos com a sonda fluorescente MDY-64 em células de <i>S. pombe</i> cultivadas na presença de ferro e curcumina.	39
Figura 10. Marcação de vacúolos em células de <i>S. pombe</i> com a sonda fluorescente FM4-64.	41
Figura 11. Análise estatística da quantificação de vacúolos com as sondas fluorescentes CMAC e FM4-64.	43
Figura 12. Organização de mitocôndrias de células de <i>S. pombe</i> marcadas com a sonda fluorescente MitoTracker Red FM	44
Figura 13. Expressão gênica do gene humano ATP13A1, que codifica para enzima homóloga Cta4 ATPase da levedura de fissão.	45
Figura 14. Expressão do gene humano ATP13A1 em diversos tipos de tumores.	46
Figura 15. Rede de interação da P5A ATPase de humanos codificada pelo gene ATP13A1.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ação da curcumina em alguns tipos de câncer.	17
Tabela 2. Quantificação de vacúolos em células de <i>S. pombe</i> marcados com diferentes sondas fluorescentes.	42
Tabela 3. Genes identificados na rede de interações com a P5A ATPase ATP13A1. ...	48

ABREVIACÕES

ATP13A1 - ATPase 13A1

CMAC - 7-amino-4-clorometilcoumarina; marcadores fluorescentes de vacúolo baseados em coumarina

Cta4 – “Cátion transporting ATPase 4”, ou ATPase transportadora de cátions 4

DMSO – Dimetilsulfido

FM4-64 - (N-(3-Trietilamoniumpropil)-4-(6-(4-(Dietilamino) fenyl) Hexatrienil) Piridinium Dibromido); marcador fluorescente de vacúolo

HEPES - N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-(2-cido etanosulfônico)

LOX-5 - Arachidonate 5-lipoxygenase

MCP-1 - Monocyte chemoattractant protein-1

NF-E2 - Nuclear Factor, Erythroid 2

P53 – Proteína supressora de tumor

RE – Retículo endoplasmático

STAT - Signal transducer and activator of transcription ou transdutor de sinal e ativador da transcrição

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

UPR - Unfolded Protein Response - resposta a proteína mal enovelada.

RESUMO

A levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* é um microrganismo de fácil manipulação genética e tem sido utilizada como modelo de estudos biomédicos e de diferentes fármacos, e para elucidação da regulação de processos fisiológicos e fisiopatológicos incluindo câncer. A curcumina, um composto bioativo obtido da *Curcuma longa* L., tem se mostrado promissora no controle da tumorigênese. A alta proliferação celular durante a tumorigênese requer o aumento na capacidade funcional do retículo endoplasmático (RE), resultando no estresse da organela, o que promove uma resposta celular específica que compromete a homeostase redox e de Ca^{2+} . Vários agentes anticâncer exercem sua atividade via modulação de estresse do RE. O objetivo deste trabalho foi elucidar os efeitos da curcumina no crescimento celular, usando como modelo a levedura de fissão cepa selvagem e a cepa mutante com deleção do gene para P5A Cta4 ATPase (*cta4Δ*), que exibe estresse crônico do RE, além de analisar a expressão e interação do gene homólogo de humanos, ATP13A1. As células de levedura foram cultivadas em diferentes concentrações de curcumina (0-100 μ M), seguida pela microscopia de fluorescência com as sondas marcadoras de vacúolos CMAC, MDY-64, FM4-64 e marcador mitocondrial Mitotracker Red FM. A análise da expressão gênica de ATP13A1 foi realizada utilizando as plataformas GTEx, GEPIA, TCGA, UALCAN e GeneMANIA. A curcumina inibiu a proliferação celular de forma dose dependente, além de causar alterações na morfologia e na citocinese. A cepa *cta4Δ* demonstrou maior sensibilidade ao tratamento à suplementação com curcumina, quando comparada a cepa selvagem. O efeito da curcumina foi revertido após adição de baixas concentrações de $FeSO_4$. Foi observada intensa fragmentação vacuolar nos tratamentos com curcumina e que a curcumina impede a marcação de mitocôndrias com a sonda fluorescente e este efeito não foi revertido com $FeSO_4$ nas células *cta4Δ*. Os resultados sugerem que a curcumina causa uma possível interferência na dinâmica de microtúbulos e citoesqueleto e na fissão/fusão vacuolar, retarda a endocitose celular e prejudica o potencial de membrana mitocondrial, impactando os sistemas endomembranas. A análise da expressão do gene humano ATP13A1 revelou maior expressão no baço e em tumores relacionados com os ductos biliares e sistema imune. Esses dados, juntamente com análise de redes de interações físicas e genéticas de ATP13A1, relacionam a P5A-ATPase com remodelamento de fluxos iônicos como parte de mecanismos de adaptação ao estresse do RE e sobrevivência em células tumorais.

Palavras-chave: levedura; endomembranas, P5-ATPase, câncer, redes de interação.

ABSTRACT

The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is a microorganism of easy genetic manipulation and has been used as a model for biomedical and pharmaceutical studies, and to elucidate the regulation of physiological and pathophysiological processes including cancer. Curcumin, a bioactive compound obtained from *Curcuma longa* L., has shown promise in the control of tumorigenesis. High cell proliferation during tumorigenesis requires an increase in the functional capacity of the endoplasmic reticulum (ER), resulting in organelle stress, which promotes a specific cellular response that compromises redox and Ca^{2+} homeostasis. Various anticancer agents exert their activity via modulation of ER stress. The aim of this work was to elucidate the effects of curcumin on cell growth, using as a model the fission yeast wild strain and the mutant strain with deletion of the gene encoding for P5A Cta4 ATPase (*cta4Δ*), which exhibits chronic ER stress, in addition to analysis of the expression and interaction of the homologous human gene ATP13A1. Yeast cells were grown in different concentrations of curcumin (0-100 μM), analyzed by fluorescence microscopy with vacuolar markers CMAC, MDY-64, FM4-64 and mitochondrial marker Mitotracker Red FM. The analysis of ATP13A1 gene expression was performed using the GTEX, GEPIA, TCGA, UALCAN and GeneMANIA databases. Curcumin inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner and caused changes in morphology and cytokinesis. The *cta4Δ* showed higher sensitivity to curcumin, when compared to the wild type cells. The effect of curcumin was reversed after adding low concentrations of FeSO_4 . Intense vacuolar fragmentation was observed in the treatments with curcumin and curcumin prevented the mitochondria staining with the fluorescent probe and this effect was not reversed in *cta4Δ* with FeSO_4 . The results suggest that curcumin causes possible interference in microtubule and cytoskeleton dynamics and in vacuolar fission/fusion, delays cellular endocytosis and impairs mitochondrial membrane potential, impacting the endomembrane systems. Analysis of human ATP13A1 gene expression revealed higher expression in the spleen and in tumors related to the bile ducts and immune system. These data, along with network analysis of ATP13A1 physical and genetic interactions, link P5A-ATPase with ion flux remodeling as part of mechanisms of ER stress adaptation and survival in tumor cells.

Keywords: Yeast; endomembranes, P5-ATPase, cancer, interaction networks.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Levedura: organismo modelo*

As leveduras são microrganismos eucarióticos com fácil manipulação genética e obtenção das células (COOPER; HAUSMAN, 2016). São largamente utilizadas em processos celulares básicos, como o ciclo celular, enovelamento de proteínas e transporte intracelular, sendo um modelo eficaz no combate a doenças humanas (KARATHIA et al., 2011; COUGHLAN, BRODSKY, 2005; HARTWELL, 2002).

Algumas leveduras são amplamente utilizadas em diversos estudos, como a levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* e a levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*, visto que possuem grande homologia com genes do genoma humano, justificando assim, o seu uso como modelo de pesquisas bioquímicas e, também moleculares (WOOD et al., 2002). Essa característica permite que mutações sejam inseridas ao longo do genoma da levedura, facilitando estudos da função biológica e consequências resultantes das mutações genômicas (BOTSTEIN; FINK, 2011).

O genoma da levedura *Schizosaccharomyces pombe* tem alto grau de homologia com o genoma humano, em 2002 teve seu genoma concluído, apresentando cerca de 5.050 genes atualmente relatados (PomBase, 2021), possibilitando sua utilização na investigação de funções bioquímicas e biológicas das vias associadas a diversas doenças humanas (WOOD et al., 2002). Esta levedura, possui 23 genes associados ao dano e reparo do DNA, controles do ponto de verificação e ao ciclo celular, sendo excelente modelo para estudo de vias específicas das doenças cancerígenas (WOOD et al., 2002). Ainda, a identificação sistemática de genes de levedura envolvidos em resistência aos estresses metabólicos e ácidos foi apontada como uma estratégia em buscas de alvos para a terapia anticâncer (SHIN et al., 2016; DOS SANTOS e SÁ-CORREIA, 2009).

O crescimento polarizado e a divisão por fissão são características do ciclo de vida da levedura *Schizosaccharomyces pombe*, que possui tempo de geração de 2 a 4 horas, em temperatura média de 30°C (PETERSEN; RUSSEL, 2016). As células desta levedura têm capacidade de crescimento e proliferação em uma variedade de meios diferentes e alcançam a fase estacionária quando os nutrientes, como glicose e nitrogênio, se tornam limitantes, cessando então, os ciclos celulares mitóticos (HAGAN; GRALLERT; SIMANIS, 2016).

Nos últimos anos, a utilização da levedura *S. pombe* tem se tornado uma forte aliada na compreensão dos mecanismos associados ao câncer, visto que este microrganismo possui

aproximadamente 30% de genes ortólogos de doenças humanas (HOFFMAN; WOOD; FANTES, 2015; FOURY, 1997; BASSETT JR.; BOGUSKI; HIETER, 1996). De acordo com o banco de dados de organismos modelo PomBase, a levedura *S. pombe* possui cerca de 188 genes homólogos aos genes humanos que são expressos em diversos tipos de câncer, dentre eles estão o gene *ras1*, homólogo de HRAS, relevante em câncer de pulmão, próstata e melanoma, o gene *byr1*, homólogo de MAP2K1, expresso em câncer de pâncreas, cabeça e pescoço e melanoma cutâneo, o gene *qcr1*, homólogo de UQCRC1, expresso em câncer de fígado, dentre outros genes (POMBASE, 2021).

1.2 Curcumina (*Curcuma longa* L.)

A utilização de espécies vegetais, ou partes de espécies vegetais, com fins medicinais, ocorre desde a pré-história, porém de forma empírica e a partir de descobertas acidentais (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). As plantas medicinais foram os primeiros recursos terapêuticos que o ser humano obteve para os cuidados com a saúde de seus familiares, o conhecimento a respeito deste uso era construído por meio de observações realizadas aos hábitos alimentares de animais herbívoros domésticos e por meio de associações entre o formato, odor e cor do alimento, como a romã, por possuir coloração avermelhada, era associada a cura de complicações circulatórias (BADKE, 2008).

A medicina tradicional chinesa e hindu foi pioneira na utilização da curcumina com fins medicinais, sendo utilizada como anti-inflamatório, para aliviar problemas digestivos e, para cicatrização, a partir do uso tópico (DE COS; PEREZ-URRIA, 2014). Os árabes e persas utilizavam a curcumina em grandes quantidades devido à sua cor amarelada, portanto, os povos a chamavam de *kourkoun*, o nome original para açafrão (CAMATARI et al., 2017).

A curcumina é um dos componentes naturais mais importantes extraído dos rizomas da *Curcuma longa* L. (Figura 1), uma espécie vegetal originária do sudeste asiático e pertencente à família botânica Zingiberaceae, popularmente conhecido como cúrcuma ou açafrão-da-terra (TOMEH; HADIANAMREI; ZHAO, 2019). Este componente tem recebido muita atenção nas últimas décadas e tem sido estudado devido ao seu potencial antitumoral, antioxidante e anti-inflamatório (CECILIO FILHO et al., 2000).

Os compostos curcuminoides desmetoxicurcumina, curcumina e bisdesmetoxicurcumina formam a cúrcuma em concentrações de 15%, 77% e 3%, respectivamente, o que lhe confere a cor amarelada e o sabor amargo presente no rizoma da *Curcuma longa* L., da qual é extraída (MHILLAJ et al., 2019). A cúrcuma foi isolada pela primeira vez em 1815 e obtida em forma cristalina em 1870, sendo solúvel em etanol e acetona,

seus componentes possuem características antioxidantes devido ao número de grupos de hidroxilas presentes na estrutura do seu anel aromático, que contém grupos o-metoxi fenólicos, ligados por uma porção β -dicetona α, β -insaturada (BARANKEVICZ, 2015).

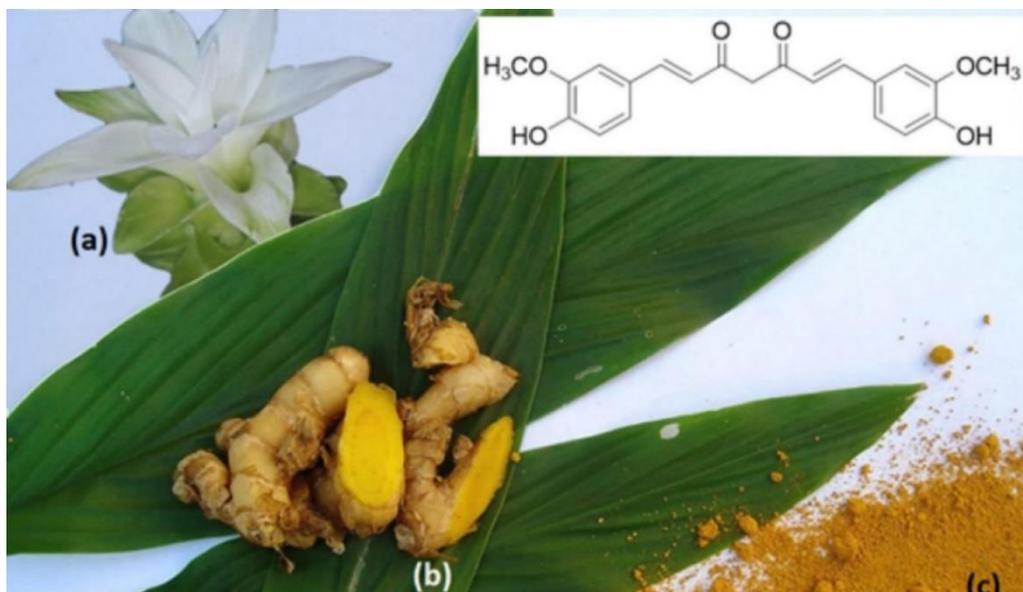


Figura 1. *Curcuma longa* L. (a) Espécime de *Curcuma longa* com inflorescência; (b) Rizomas frescos; (c) Turmerico: rizomas secos e moídos. (Fonte: SUETH-SANTIAGO, 2015).

A atividade antioxidante da curcumina é mediada principalmente pelos grupos fenólicos por meio da oxidação e transferência de elétrons, ou seja, eliminando os radicais livres e retardando o progresso de algumas doenças crônicas, como o câncer (PRADO-AUDELO et al., 2019). O uso da curcumina via administração crônica pode apresentar ação neuroprotetora, resultando em um aumento das enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase, visto que seu baixo peso molecular facilita a passagem pela barreira hematoencefálica (HUANG et al., 2018).

Existem diversos alvos moleculares os quais a curcumina atua, entre eles estão os fatores de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B), AP-1, β -catenina, STAT-1, STAT-3, STAT-4, p53, NF-E2; as proteínas quinases JNK, proteína quinase dependente de AMPc, IKK, proteína quinase A; as proteínas reguladoras do ciclo celular Ciclina D1, Ciclina E, c-Myc, P21; os fatores de crescimento HER2, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator tissular, fator de crescimento epidermal, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento de hepatócitos; e os mediadores inflamatórios proteína C-reativa, interleucinas 1 β , 2, 5, 6, 8, 12 e interleucina 18, LOX-5, MCP-1, Interferon γ , TNF- α (COLLINO, 2014).

A proliferação de células envolvidas com a resposta imunológica, como os macrófagos e células natural *killer* pode ser modulada através do uso da curcumina, que pode induzir a

morte celular por apoptose a partir do aumento do estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial em linfócitos T-CD4 (PALMA et al., 2013).

1.2.1 Curcumina e seus efeitos na célula animal

A atividade de curcumina varia de acordo com a concentração usada, apontada por ter efeito hormético (STEPIEN et al, 2020; ZHOU; BEEVERS; HUANG, 2011), sendo benéfico em baixas concentrações e tóxico em altas. A atividade da curcumina pode variar de acordo com o alvo molecular. Em células de carcinoma papilar, por exemplo, a curcumina induz à apoptose a partir da redução do potencial de membrana mitocondrial, induz o estresse do retículo, caracterizado pela expansão do retículo endoplasmático, ativação da UPR, aumento do influxo de Ca^{2+} intracelular e, conseqüente morte celular (ZHANG et al., 2018). A curcumina inibe o potencial metastático em células de câncer de bexiga a partir da diminuição na expressão de proteínas como MMP-2 e MMP-9 (metaloproteinases da matriz extracelular), em doses a partir de 10 μ M (SHI et al., 2017). Em células de linfoma e leucemia, a curcumina induz a proteína p53, uma proteína supressora de tumor que controla o ciclo celular e leva a apoptose celular (OTONI; NARDIN, 2017; PARRALES; IWAKUMA, 2015). A curcumina também induz células de melanoma de camundongos à apoptose, regula positivamente a expressão de mmu-miR-205-5p e, negativamente, a expressão de Bcl-2, suprime a via JAK-2/STAT3 resultando em inibição da proliferação e da invasão celular (LELLI; PEDONE; SAHEBKAR, 2017; WANG et al., 2017).

O composto pode inibir a via de sinalização PI3K-Akt-mTOR (importante na proliferação celular e angiogênese), a transdução e transcrição e o crescimento tumoral de forma semelhante aos quimioterápicos (GONÇALVEZ, 2015). Existem dois principais mecanismos de ação em que a curcumina atua, a inibição de proteínas, como a YAP, responsável pela proliferação celular e inibição da apoptose, a partir da ativação de marcadores de autofagia, como o LC3-II e P62; e a partir da ativação do fator de apoptose e inibição da sinalização de proliferação celular e angiogênese (BARBOSA et al., 2018). Além disso, a curcumina pode induzir a morte de células de linfoma pela inibição do NF- κ B, pela liberação do citocromo c e inibição da Akt em células renais cancerígenas (MACKENZIE et al., 2008; WOO et al., 2003).

Em células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, a curcumina pode inibir a peroxidação lipídica usando o linoleato, um ácido graxo que pode ser oxidado e formar um radical de ácido graxo, pode neutralizar os radicais livres e até eliminá-los (WILKEN et al.,

2011). A curcumina pode reduzir o número de células viáveis quando utilizada em estudos contra o melanoma humano, incubadas por 24, 48 e 72 horas (RABELO; BRETAS; GUILLO, 2002). Em células de linfoma e leucemia, a curcumina induz a proteína p53, uma proteína supressora de tumor que controla o ciclo celular e leva a apoptose celular (OTONI; NARDIN, 2017; PARRALES; IWAKUMA, 2015).

A curcumina possui um potencial uso no combate às diversas células de câncer, apresentando diversos tipos de ação (Tabela 1).

Tabela 1. Ação da curcumina em alguns tipos de câncer.

Tipos de câncer	Mecanismo de ação da curcumina	Referências
Cólon e reto	Indução de apoptose ou necrose	Garcea et al., 2005; Ferreira, 2014.
Tireoide	Indução de apoptose, estresse do retículo e disfunção mitocondrial nas células T CD4	Zhang et al., 2018.
Bexiga	Supressão das vias de sinalização da metaloproteinase da matriz (MMP) - 2 e MMP-9	Shi et al., 2017.
Mama	Regulação negativa da atividade de ERK1 / ERK2 MAP quinases; dose dependente.	Masuelli et al., 2013.
Pele	Indução de apoptose	Wang et al., 2017.
Pâncreas	Indução da proteína forkhead box O1 (FOXO1) e inibição da via PI3K/Akt	Zhao et al., 2015.
Fígado	Inibição de NF- κ B	Marquardt et al., 2015.

1.2.2 Curcumina e seus efeitos em células de levedura

A curcumina pode agir contra uma variedade de fungos diferentes, incluindo os fitopatógenos *Alternaria solani* e *Fusarium udum*, que têm o seu crescimento micelial inibido com o efeito de óleos voláteis do rizoma da *Curcuma longa* (BALBI-PEÑA et al., 2006). O possível mecanismo de ação da curcumina está relacionado com a redução do ergosterol, o que resulta no acúmulo de precursores biossintéticos do ergosterol, levando à morte celular por

geração de ROS (espécies reativas de oxigênio), além disso, a curcumina também inibe o desenvolvimento de hifas em *Candida albicans*, visando a captação do supressor timidina-1 (TUP1), e pode ter seu efeito aumentado quando em sinergia com algumas drogas como cetoconazol, fluconazol e anfotericina B, no combate às infecções fúngicas sistêmicas (ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

A curcumina pode atuar em diversas vias nas células fúngicas, levando à morte celular por apoptose induzida por espécies reativas de oxigênio, biossíntese alterada do ergosterol e, ainda, modular a atividade de inúmeros fármacos, inibindo a resistência fúngica aos medicamentos utilizados no tratamento da candidíase, por exemplo (KUMAR et al., 2014). O crescimento de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 na presença da curcumina resulta em um decréscimo na contagem de colônias, de acordo com o tempo de incubação (24, 48 e 72 horas) e, modificações morfológicas como diminuição do tamanho celular e da cápsula polissacarídica, após 72 horas de tratamento em *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 24065 (FREITAS et al., 2017).

Os vários mecanismos de ação da curcumina nos diferentes tipos de células ainda não foram completamente elucidados, sabe-se que a curcumina pode limitar a disponibilidade de cofatores de ferro essenciais para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto, a suplementação com ferro pode diminuir o efeito fisiológico da curcumina e recuperar o fenótipo normal da célula (AZAD et al., 2013).

1.2.3 Curcumina e seus efeitos em ATPases

A inibição da SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) pela curcumina é estruturalmente específica, pois exige a presença de um grupo OH⁻ na posição dos 4 anéis, e na presença do íon fosfato há o aumento na taxa de acumulação do Ca^{2+} (LOGAN-SMITH et al., 2001). A curcumina atua como um potencial inibidor da SERCA, pois interrompe a homeostase do cálcio, aumentando a concentração de Ca^{2+} citosólico e levando à apoptose de células de câncer de ovário (SEO et al., 2016).

Em células de hepatoma a curcumina regula o pH intracelular modulando o nível de proteínas extrusoras de prótons, sugere-se que pode inibir a V-ATPase (KIM et al., 2019). A curcumina também pode aumentar a morte celular induzida por lisossomo em células de câncer de cólon humano, na presença de *Bafilomicina A*, inibidor específico da V-ATPase (ZHANG et al., 2016).

1.3 *Sistemas Endomembranas*

Os sistemas endomembranas são compostos por membranas e organelas celulares que estão conectadas, formando uma rede que caracteriza a via endocítica e a via secretora e participam diretamente do tráfego de vesículas (SCOTT; VACCA; GRUENBERG, 2014; MAXFIELD; MCGRAW, 2004). Dentre as membranas e organelas que compõem o sistema endomembranas estão o envoltório nuclear, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vacúolos/lisossomos, vesículas de transporte e a membrana plasmática. A interação entre o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi envolve o transporte de proteínas ou vesículas, em que o RE é responsável pelo transporte até o aparelho de Golgi e deste para o exterior da célula, caracterizando a via secretora (ALBERTS et al., 2010). Na via endocítica, as moléculas são entregues aos vacúolos/lisossomos por meios dos endossomos, iniciais e tardios (GADILA; KIM, 2016; GUO; SIRKIS; SCHEKMAN, 2014). O processo de formação e transporte de vesículas é coordenado por um grupo de Rab GTPases recrutadoras de revestimento que garantem a montagem correta dos revestimentos sobre os endossomos e as direcionam para os locais específicos na membrana-alvo, onde proteínas SNARE medeiam a fusão das membranas (ALBERTS et al., 2010; ZERIAL; MCBRIDE, 2001).

O retículo endoplasmático e os vacúolos formam sítios de contato importantes para a sobrevivência da célula. Quando há carência de nutrientes, a célula organiza estoques de lipídios e os disponibiliza na interface física entre RE e vacúolos (HARIRI et al., 2018). Diversas proteínas e metabólitos presentes nos vacúolos são sintetizados no RE e transportados para os vacúolos através do tráfego de vesículas mediadas por COPII do RE para o Golgi (XIANG; ETXEBERRIA; VAN DEN END, 2013). Entretanto, há uma rota de tráfego entre RE e vacúolo que não envolve o aparelho de Golgi e sim a maquinaria de autofagia (MICHAELI; AVIN-WITTENBERG; GALILI, 2014; VIOTTI et al., 2013), parte integrante da via UPR desencadeada em resposta ao estresse do retículo endoplasmático (YANG et al., 2016; LIU et al., 2012). Além disso, os íons de Ca^{2+} são armazenados nos vacúolos, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático, portanto, os vacúolos participam ativamente na sinalização e troca de Ca^{2+} com o RE, através de Ca^{2+} ATPases (JI et al., 2006; DUNN; GABLE; BEELER, 1994).

O retículo endoplasmático também interage com a mitocôndria, por meio das membranas associadas à mitocôndria, ou MAMs (HERRERA-CRUZ; SIMMEN, 2017). As mitocôndrias não estão envolvidas no tráfego vesicular, mas essa interação é importante para a troca de Ca^{2+} entre as duas organelas, além de troca de lipídios (LEVINE; PATEL, 2016) e

indução de autofagia (HAMASAKI, et al., 2013). Portanto, a interrupção desta interação resulta em diversas doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson e câncer (COHEN; VALM; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2018; BRAVO-SAGUA et al., 2014). As mitocôndrias e o retículo endoplasmático mantêm múltiplas interações, entre elas a MERC (contatos RE-mitocôndria) em que envolve diferentes proteínas interligando as duas organelas, como a Drp1-Inf2 (dinamina) e a Mfn 1/2 (mitofusina), entre outras (HAYASHI; SU, 2007), e a ERMES (Retículo Endoplasmático e Estruturas de Encontro de Mitocôndrias) complexo multiproteico fundamental na manutenção da morfologia mitocondrial e de suas funções, é composto pelas proteínas Mdm34, Mdm12, Mdm10 e Mmm1 (KUNDU; PASRIJA; 2020; KORNMANN et al., 2009).

1.3.1 Retículo Endoplasmático

O RE é uma das maiores organelas presentes no citoplasma da célula, é contínuo com a membrana no núcleo e dividido em duas partes, o RE liso e o RE rugoso, que possui ribossomos associados (REID; NICCHITTA; 2015). Frequentemente associado à via exocitótica celular, o RE é caracterizado por uma rede de túbulos ramificados e sacos achatados interconectados pelo lúmen, em que ocorre a passagem de moléculas entre seus dois compartimentos, já a membrana do RE é o divisor entre o citoplasma da célula e o lúmen do RE (OAKES; PAPA, 2015).

Dentre as principais funções associadas ao RE estão a síntese, transporte e enovelamento de proteínas de membrana e síntese e metabolismo de lipídios e carboidratos (WESTRATE et al., 2015). É uma organela multifuncional, altamente dinâmica, que constitui a entrada na via secretora, além de contribuir para a homeostase do cálcio (SICARI et al., 2020). Atua no transporte das proteínas até o Golgi ou proteínas secretadas como vesículas, porém, alguns fatores fisiológicos, químicos ou patológicos podem comprometer a homeostase do retículo, resultando em estresse (HU et al., 2020).

As proteínas mal-enoveladas ou desenoveladas ficam retidas no retículo endoplasmático ou são levadas de volta ao citoplasma para que possam ser degradadas nos proteassomos. Quando a síntese de proteínas excede a capacidade de enovelamento do retículo endoplasmático, estas se acumulam e caracterizam uma condição chamada de estresse do retículo endoplasmático – ERE (TABAS; IRON, 2011). Com objetivo de reverter esta condição, a célula ativa uma série de mecanismos conhecidos como resposta a proteínas mal-enoveladas (UPR), presente desde leveduras a humanos (WANG; KAUFMAN, 2016). A via

UPR é iniciada pela ativação de três sensores de estresse: IRE1, enzima que requer Inositol; PERK, quinase do RE semelhante a PKR; e ATF6, fator de transcrição 6 (CALFON et al., 2002; YOSHIDA et al., 2001). As proteínas que não podem ser enoveladas corretamente após ativação da via UPR são degradadas através da via de degradação das proteínas associadas ao retículo endoplasmático. Quando há longo ERE o resultado é a morte celular por apoptose (XIE; NG, 2010).

O estresse do RE também pode ser consequência de perturbações na homeostase de íons essenciais, como cálcio e ferro entre RE, citoplasma e mitocôndria. A sinalização do Ca^{2+} é regulada por Ca^{2+} ATPases do tipo P2 e P5, desta forma, qualquer ausência e/ou deficiência dessas ATPases culmina em estresse do RE (KAUFMAN; MALHOTRA, 2014). Durante o estresse do RE, o Ca^{2+} é liberado e entra na mitocôndria por meio do contato RE-mitocôndria, como resposta ao estresse agudo. Ao entrar em estresse crônico não resolvido, após a tentativa de ativação da via UPR, a célula entra em morte celular (WANG; KAUFMAN, 2016). A depleção dos estoques de Ca^{2+} no retículo endoplasmático é uma forma severa de ERE e sinaliza respostas celulares como a morte celular programada ou apoptose.

1.3.2 Vacúolos

Os vacúolos são organelas altamente dinâmicas que podem sofrer modificações em tamanho e morfologia em resposta a alterações ambientais (BANTA et al., 1988). Semelhantes aos lisossomos, são importantes em diversos processos, incluindo a regulação da homeostase celular, degradação de componentes celulares e armazenamento de íons, metabólitos e nutrientes (KLIONSKY; HERMAN; EMR, 1990). O tamanho dos vacúolos pode ser alterado de acordo com que a célula cresce em tamanho. Em leveduras de brotamento, os vacúolos são uma herança para as células-filhas (CHAN et al., 2016; WEISMAN; BACALLAO; WICKNER, 1987). Os vacúolos da levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* são mais numerosos e a herança para as células-filhas é proporcional ao espaço disponível no citoplasma, não exigindo posicionamento ativo dos vacúolos (CHADWICK et al., 2020; MULVIHILL et al., 2001). A maioria dos vacúolos pode estar posicionada ao redor do núcleo, seguido por uma minoria que se encontra nas extremidades da célula, essa distribuição é simétrica e espelhada, em relação ao núcleo (CHADWICK et al., 2020). O posicionamento dos vacúolos pode ser afetado por mutações ou alterações na actina ou citoesqueleto, uma vez que estão conectados à rede de microtúbulos (MULVIHILL et al., 2001). Ao ocorrer ruptura nos microtúbulos, a localização de vacúolos ao redor do núcleo é parcialmente perdida, sugerindo que há uma participação ativa dos microtúbulos na localização vacuolar (CHADWICK et al., 2020).

A fusão e fissão dos vacúolos é um processo dependente de diversos fatores e proteínas, como a participação ativa da V-ATPase, em que a unidade V_0 atua na fusão das membranas vacuolares (PETERS et al., 2001), e das vias Sty1, Pmk1 e Ypt7 responsáveis pela resposta ao estresse hipotônico (BONE et al., 1998). A ausência da proteína Vps1, relacionada à dinamina, pode resultar em vacúolos menores e com capacidade de fusão e fissão reduzida (RÖTHLISBERGER et al., 2009). O pH do lúmen vacuolar é normalmente ácido em relação ao citoplasma, cujo pH está próximo à neutralidade, em torno de 6.0, devido ao transporte ativo de prótons do citoplasma para o vacúolo pela V-ATPase (MARTÍNEZ-MUÑOZ; KANE, 2008; PRESTON; MURPHY; JONES, 1989).

1.3.3 Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas encontradas na grande maioria dos eucariotos, possuem duas membranas, a membrana mitocondrial interna e a externa que envolvem dois compartimentos, o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial. Essas organelas fornecem energia e metabólitos para a célula e participam de diversos processos como a sinalização de espécies reativas de oxigênio, troca de Ca^{2+} , diferenciação celular e apoptose (LABBÉ; MURLEY; NUNNARI, 2014). Um dos principais papéis das mitocôndrias é gerar ATP para a célula, processo este resultante da fosforilação oxidativa e tem como subproduto a geração de espécies reativas de oxigênio (KAUSAR; WANG; CUI, 2018). Além disso, as mitocôndrias são importantes locais de armazenamento de cálcio e podem regular as respostas de cálcio (ANNESLEY; FISHER, 2019), assim como a desregulação de Ca^{2+} pode causar danos à função mitocondrial (BRAVO-SAGUA et al., 2011). Quando a homeostase de Ca^{2+} é perturbada, há liberação de Ca^{2+} do retículo à membrana associada à mitocôndria, resultando em perda do potencial de membrana mitocondrial e, conseqüente, apoptose (MARCHI, et al., 2018).

As mitocôndrias também desempenham um papel fundamental no metabolismo do ferro (TORTI; TORTI, 2013; MARTINS et al., 2018). O ferro é de grande relevância para o metabolismo energético, respiração e síntese de DNA, facilitando diversas reações biológicas, entretanto, pode participar de reações prejudiciais à célula, como a geração de espécies reativas de oxigênio (MANZ et al., 2016). Neste contexto, as mitocôndrias são essenciais, uma vez que a regulação e homeostase do ferro é realizada cuidadosamente pelas mitocôndrias, reduzindo os riscos de toxicidade pelo ferro (RICHARDSON et al., 2010). Os mecanismos pelos quais as mitocôndrias adquirem ferro ainda não foram completamente elucidados, contudo, é provável que vários mecanismos contribuam para a entrega de ferro às mitocôndrias (PAUL et al., 2017). Uma das vias de entrega de ferro é através da transferrina, em que o ferro se liga à proteína

transferrina e os endossomos formam contatos transitórios com a membrana externa da mitocôndria, gerando uma transferência de ferro direta, evitando reações indesejadas com o citosol rico em oxigênio (HAMDI et al., 2016; SHEFTEL et al., 2007). Na membrana interna da mitocôndria de leveduras estão presentes as proteínas mitoferrinas Mrs3 e Mrs4 capazes de transportar o ferro entregue pela transferrina até a matriz mitocondrial (FOURY; ROGANTI, 2002). Uma vez na matriz mitocondrial, o ferro é utilizado para três funções básicas, a síntese de heme, biogênese do cluster ferro-enxofre e armazenamento de ferritina mitocondrial, portanto, a interrupção no metabolismo mitocondrial do ferro pode levar ao estresse ou morte celular (PAUL et al., 2017). As mitocôndrias também desempenham um papel adicional como um sensor para a regulação da aquisição de ferro celular e distribuição intracelular (MARTINS et al., 2018).

1.4 ATPases de Ca^{2+} e H^+

As ATPases são enzimas transmembrana que controlam o fluxo de íons como o K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , nas células de diferentes organismos vivos, utilizando energia livre a partir da hidrólise do ATP e mantêm o gradiente eletroquímico, sendo fundamental para a sobrevivência da célula (CASEY; GRINSTEIN; ORLOWSKI, 2010; JORGENSEN; HÅKANSSON; KARLISH, 2003).

Dentre os transportadores ATPase do tipo P que regulam estoques intracelulares de cálcio estão Ca^{2+} -ATPases do tipo P2 e P5A. A Cta4 ATPase de levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* foi a primeira P5A ATPase a ser caracterizada quanto ao seu envolvimento na homeostase de cálcio no retículo endoplasmático, citoplasma e núcleo, e apresenta enzima homóloga codificada pelo gene ATP13A1 em humanos (OKOROKOVA-FAÇANHA et al., 2002; 2016; LUSTOZA et al., 2011). A Ca^{2+} -ATPase codificada pelo gene ATP13A1 em humanos, está presente no retículo endoplasmático e participa de funções básicas do RE como enovelamento e processamento de proteínas, além de geralmente ser expressa em todos os tipos celulares, podendo ter sua funcionalidade estudada em leveduras (SØRENSEN et al., 2018). A ausência de ATP13A1 induz a resposta a proteína mal enovelada com fator importante no sistema nervoso, uma vez que sua expressão é maior em tecidos do cérebro, associando a diversas doenças neurodegenerativas (COHEN et al., 2013).

Nosso conhecimento atual sobre a fisiologia e as funções dessas bombas únicas e enigmáticas são baseadas essencialmente em caracterização genética e bioquímica de ATPases do tipo P5A de levedura e planta. A perda de ATPases do tipo P5A tem um efeito profundo em

vários processos, incluindo o estabelecimento e manutenção da polaridade celular, citocinese, homeostase iônica e glicosilação, dobramento e secreção de proteínas (OKOROKOVA-FAÇANHA; COGO; PALMA, 2016). As ATPases do tipo P5A foram localizadas no retículo endoplasmático, portanto, não é surpreendente que a perda e/ou inibição dessa ATPase teria um efeito drástico na homeostase do retículo endoplasmático e processos que dependem do funcionamento do retículo endoplasmático.

Os prótons participam de uma gama de processos fundamentais, como a regulação do pH citoplasmático, acidificação de organelas, além da formação e a manutenção do gradiente eletroquímico através da membrana, que serve como uma força motora para sistemas secundários de transporte de íons, aminoácidos e açúcares. A homeostase de H^+ é mantida pela atividade coordenada de diferentes transportadores, sendo as principais ATPases protônicas do tipo P, V e F, que são capazes de transportar prótons através das membranas contra o seu gradiente eletroquímico, usando a energia da hidrólise do complexo ATP-Mg (NELSON, 1992). As V-ATPases são localizadas nos vacúolos e outras endomembranas, como endossomos, lisossomos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e vesículas secretórias (SAMARÃO et al. 2009), e na membrana plasmática em células de câncer, exercendo o papel importante no controle de pH extra e intracelular, requerido para proliferação e controle de tumorigênese (MARTINS et al, 2019).

2 OBJETIVO

2.1 *Objetivo Geral*

Estudar mecanismo de ação de curcumina sobre a dinâmica vacuolar e a proliferação celular no organismo modelo *Schizosaccharomyces pombe* visando entender os mecanismos antitumorais deste fitoterápico.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Analisar o efeito da curcumina na proliferação, polaridade e morfologia de células;
- Determinar efeito de ferro em células expostas a curcumina;
- Analisar distribuição, número e morfologia de vacúolos em células expostas a curcumina;
- Analisar organização da rede de mitocôndrias em células expostas a curcumina;
- Comparar sensibilidade a curcumina entre células sem e com estresse crônico do retículo endoplasmático.
- Analisar expressão gênica de P5ATPase de humanos, ATP13A1.

3 METODOLOGIA

3.1 Cepas microbianas utilizadas

As cepas de *Schizosaccharomyces pombe* utilizadas para este estudo foram a cepa selvagem *wt* Fy1180 (genótipo h^+ *otr1R(Sph1)::ade6⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6-M210*), e a cepa mutante *cta4Δ* Hu285 (genótipo h^+ *cta4::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6-M216*) deficiente na Cta4 ATPase (OKOROKOVA-FAÇANHA et al., 2002).

3.2 Meios de cultura e manutenção

Para o cultivo das cepas Fy1180 e Hu285, em meio líquido, foi utilizado o meio rico YES (“yeast extract medium with supplements”; MORENO et al., 1991) contendo 0,5% de extrato de levedura; 3% de glicose; 75 mg L⁻¹ dos aminoácidos arginina, histidina e leucina, e 75 mg L⁻¹ dos nucleotídeos adenina e uracila, sendo o meio para a mutante sem uracila. Os meios utilizados foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C, e mantidos em temperatura ambiente até a utilização. As cepas foram inoculadas em meio líquido YES e cultivadas por 48 horas. As células foram então cultivadas na presença de curcumina (Sigma Aldrich, C1386) nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 μM a 30°C por 48 a 72 horas ou até o aparecimento de colônias. Os cultivos também foram realizados na presença concomitante ou não de FeSO₄ nas concentrações de 50 e 100 μM.

Para o cultivo em meio sólido, foram acrescentados 2,5% de ágar à concentração final. Os meios sólidos foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C, vertidos em placas de Petri no fluxo laminar, mantidas na estufa a 30°C por 48 ou 72 horas e, posteriormente, armazenadas a 4°C.

Para a manutenção das cepas, uma alçada das colônias das células de levedura foi retirada de uma “placa-estoque” e semeada em outra placa fazendo estrias contínuas, de três em três meses. A placa foi incubada a 30°C até aparecimento de colônias (3 dias para cepa Fy1180 e 4 dias para cepa Hu285) e armazenadas a 4°C.

3.3 Avaliação do efeito da curcumina em culturas de *S. pombe* em meio líquido

As células das cepas Fy1180 e Hu285 foram inoculadas em meio YES, incubadas a 30°C em um agitador orbital a 250 rpm até que as culturas atingissem a fase estacionária do crescimento e, posteriormente, foram utilizadas para a determinação espectrofotométrica da

densidade óptica (DO) da cultura, medida ao comprimento de onda de 640nm (DO₆₀₀). Uma alíquota de cada pré-cultura foi diluída em novo meio YES até DO₆₀₀ = 0,2 (ou 0,1) e a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação das culturas foram acompanhados retirando alíquotas de ambas as cepas para leituras de DO₆₀₀ a cada 3 horas, ao longo do tempo de incubação de 46 horas. As células foram cultivadas na ausência ou na presença de curcumina nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 µM (a partir do estoque de 1 mM em DMSO) para avaliar o efeito na proliferação e morfologia celular.

3.4 Avaliação do efeito da curcumina em culturas de *S. pombe* em meio sólido

Uma pequena quantidade de células de levedura (uma colônia de diâmetro médio) foi retirada da placa e ressuspensa em 200 µl de água estéril em uma placa multi-poços. Uma quantidade de 50 µl desta suspensão de células foi transferida para o seguinte poço da placa contendo 200 µl de meio YES. Este passo foi repetido 3 vezes, obtendo ao final, 3 poços com diluições seriadas consecutivas da suspensão inicial. Alíquotas de 5 µl de cada poço foram retiradas e transferidas com a ajuda de uma pipeta comum para placas de Petri, contendo meio YES, suplementado com curcumina nas concentrações de 10 µM e 100 µM e FeSO₄ nas concentrações de 50 e 100 µM e incubadas por 3 dias a 30°C.

3.5 Marcação de vacúolos em células de *S. pombe*

A organização e morfologia vacuolar foi avaliada por meio da marcação com sondas fluorescentes CMAC e MDY-64 usando o kit de marcação vacuolar (Molecular Probes, Y7531) e a sonda FM4-64 (3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide; Invitrogen, T3166) de acordo com as recomendações do fabricante. O kit é composto por uma sonda azul-fluorescente, uma conjugada a cumarina, capaz de marcar seletivamente o lúmen vacuolar [CMAC-(7-amino-4-chloromethyl-coumarin)] e a outra verde-fluorescente marcadora da membrana vacuolar de leveduras (MDY-64). Inicialmente, as cepas *wt* e *cta4Δ* foram cultivadas por 16 horas, até atingirem a densidade óptica igual à 2,0, nas seguintes condições: meio YES sem tratamento (CTR), na presença de 50 µM FeSO₄, 50 µM curcumina e 50 µM FeSO₄ + 50 µM curcumina. Para o preparo das amostras, cada tratamento (1 ml) foi colocado na microcentrífuga a 3.000×g por 3 minutos, em seguida foi retirado o sobrenadante e a amostra foi lavada com tampão HEPES (10 mM HEPES, pH 7.4, contendo 5% de glicose, para a marcação com as sondas CMAC e MDY-64) ou meio YES (para a

marcação com a sonda FM4-64), este processo foi repetido duas vezes e, por último, as amostras foram ressuspensas em 500 µl de tampão HEPES ou meio YES. Os marcadores seletivos CMAC e MDY-64 foram utilizados simultaneamente, em concentração de 100 µM e 10 µM (a partir do estoque de 10 mM, dissolvidas em DMSO), respectivamente, entretanto, a sonda MDY-64 foi acrescentada em uma alíquota dos cultivos previamente incubados com CMAC nos 5 minutos finais da incubação, totalizando 30 minutos de incubação. A sonda FM4-64 foi utilizada em concentração de 5 µM (a partir do estoque de 10 mM, dissolvida em DMSO), incubada por 15 minutos e 1 hora, e analisada nos dois tempos. As células nos tratamentos com curcumina foram lavadas novamente com tampão HEPES ou meio YES, após a incubação das sondas por 30 minutos. Para o preparo das lâminas, foram adicionados 10 µl de poli-L-lisina sobre as lâminas e estas foram mantidas na estufa a 37°C até a secagem completa. Em seguida, foram adicionados 10 µl da suspensão celular, que foram cobertos por uma lamínula.

As amostras de células foram analisadas por microscopia em DIC e fluorescência, em objetivas com aumento de 63 ou 100×, em microscópio Zeiss Axion Imager A.2 acoplado à câmera digital AxioCam 2.0 e filtro UV-DAPI (excitação 365/12, emissão LP 397, beamsplitter FT 395) para CMAC e o filtro FITC (excitação BP 450-490, emissão LP 515, beamsplitter FT 510) para MDY-64, filtro set 15 (excitação 546/12, emissão LP 590, beamsplitter FT 580) para FM4-64. As imagens foram processadas no software AxionVision versão 4.9. Nas figuras foram mostrados apenas algumas células, representativas de toda a população.

3.6 *Marcação de mitocôndrias em células de S. pombe*

As células das cepas Fy1180 (*wt*) e Hu285 (*cta4Δ*) foram cultivadas em meio YES (pH 4,5) nas seguintes condições: meio YES sem tratamento (CTR), 50 µM FeSO₄, 50 µM curcumina, e 50 µM FeSO₄ + 50 µM curcumina, por 15 horas até atingirem a densidade óptica igual à 2,0. Após o cultivo, uma alíquota de 1 ml da cultura celular foi retirada, transferida para tubo e centrifugada a 3.000×g por 3 minutos. As células sedimentadas foram lavadas em 1 ml de tampão HEPES (10 mM HEPES, pH 7,4, contendo 5% de glicose) e a suspensão celular foi novamente submetida à centrifugação a 3.000×g por 3 minutos. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 500 µl de tampão HEPES e, adicionados 100 nM (a partir do estoque de 1 mM, dissolvida em DMSO) de MitoTracker Red FM (Invitrogen, M22425). As células foram incubadas com a sonda MitoTracker Red FM por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras de células com curcumina foram centrifugadas a 3.000×g por 3 minutos, e o sedimentado foi lavado em 1 ml de tampão HEPES, centrifugado a 3000×g por 3

minutos e finalmente ressuspensão em 500 µl de tampão HEPES. Em seguida foram adicionados 10 µl de agarose *low melting* (1% em água) em uma lâmina e após secagem completa foram adicionados 10 µl da suspensão celular que foram cobertos por uma lamínula. As amostras de células foram observadas em objetivas com aumento de 63 ou 100× em microscópio de fluorescência Zeiss Axion Imager A.2 acoplado a câmera digital AxioCam 2.0. A fluorescência de excitação da sonda foi de 490 nm e de emissão foi de 516 nm em filtro set 15 (excitação 546/12, emissão LP 590, beamsplitter FT 580). As imagens foram capturadas usando o software AxioVision versão 4.9. Nas figuras foram mostrados apenas algumas células, representativas de toda a população.

3.7 *Análise estatística*

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para determinar as diferenças entre os tratamentos e o controle. As diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,05$) foram indicados por diferentes letras ou asteriscos.

3.8 *Análise da expressão gênica de ATP13A1*

As análises do gene humano ATP13A1 foram realizadas utilizando ferramentas e banco de dados públicos disponíveis nas plataformas GTEx (Genotype-Tissue Expression) e UALCAN (CHANDRASHEKAR et al., 2017), que usa banco de dados públicos TCGA (The Cancer Genome Atlas). A análise de interações de ATP13A1 foi realizada usando plataforma GeneMANIA (WARDE-FARLEY et al., 2010).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito da curcumina no cultivo de células de *S. pombe*

4.1.1 Ensaio no meio líquido

Com objetivo de avaliar o efeito da curcumina em culturas da cepa selvagem (*wt*) e mutante deficiente de Cta4 ATPase (*cta4Δ*) de *S. pombe*, as células foram cultivadas em meio líquido YES, na ausência e na presença de 10, 50 e 100 μM de curcumina. Observamos que as culturas expostas à curcumina apresentaram inibição na proliferação celular, de acordo com a concentração de curcumina (Figura 2), evidenciada pela diminuição da densidade ótica de suspensões celulares. Após 22 horas de cultivo a 30°C e 250 rpm, quando as culturas já alcançaram a fase estacionária de crescimento, o tratamento com 10 μM de curcumina demonstrou inibição do crescimento celular de ~6% em *wt* e *cta4Δ*, quando comparada com o grupo controle. Todavia, ao aumentar a concentração da curcumina, a taxa de inibição também foi elevada, indicando a inibição dose dependente. A adição de 50 μM de curcumina causou 60% de inibição no crescimento em culturas *wt* e 55% em *cta4Δ*. Nos tratamentos com 100 μM de curcumina a taxa de inibição aumentou para 92% em *wt* e 87% em *cta4Δ* (Figura 3).

Estudos anteriores demonstraram que a curcumina pode formar complexos com ferro (BERNABÉ-PINEDA et al., 2004), atuando como quelante do ferro intracelular, alterando os níveis e perturbando a sua homeostase (MINEAR et al., 2011). Conhecendo essa característica da curcumina analisamos os efeitos do ferro no cultivo de células de *S. pombe*. Ao suplementar o meio de cultivo com 50 μM FeSO_4 nos cultivos tratados com 50 μM curcumina, foi possível observar que o efeito inibitório da curcumina na proliferação de *S. pombe* foi revertido (Figura 4).

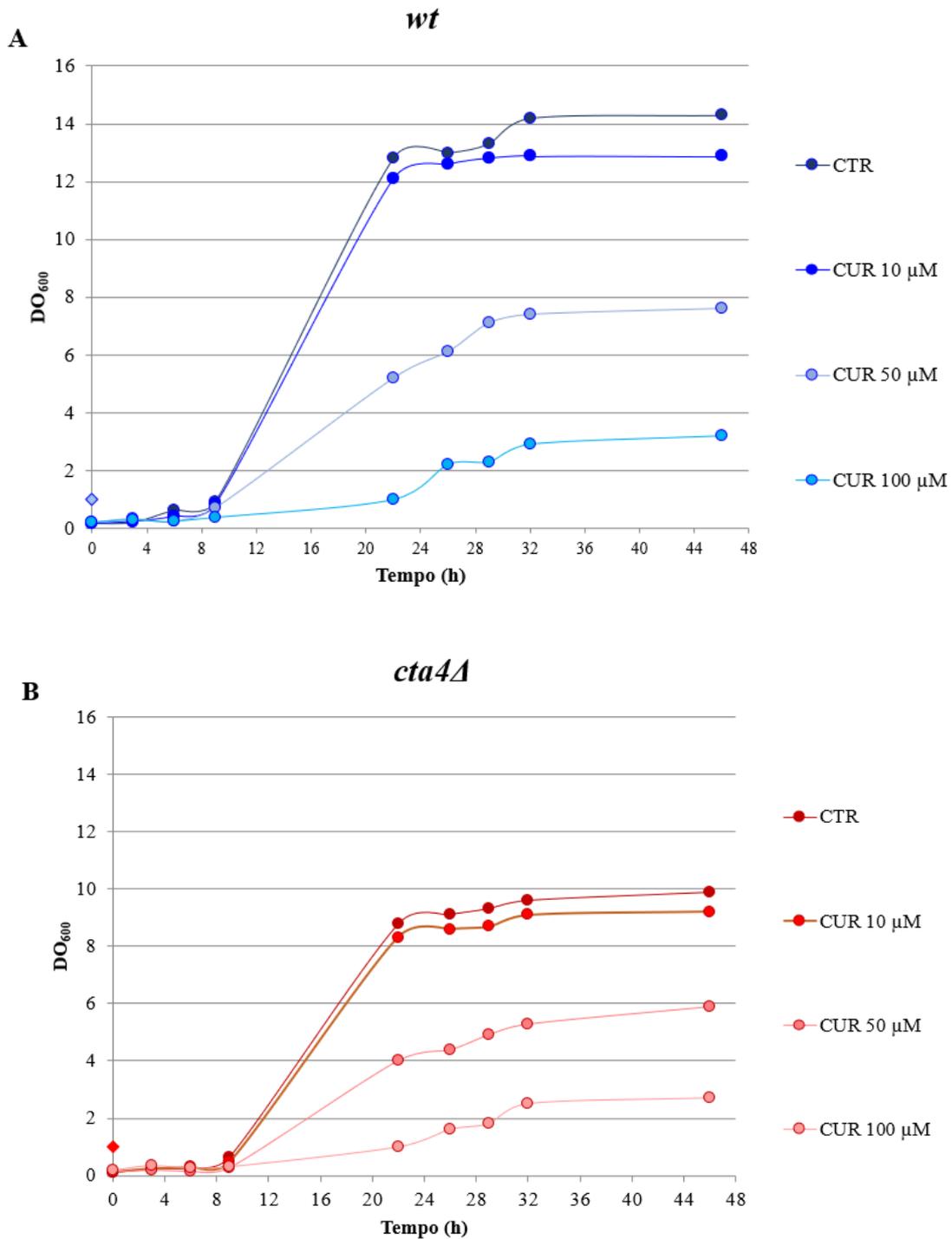


Figura 2. Curvas de crescimento de *S. pombe* na presença de curcumina. As células da cepa selvagem *wt* (A) e mutante *cta4Δ* deficiente de Cta4 ATPase (B) foram cultivadas em meio líquido YES na presença de diferentes concentrações de curcumina (10, 50 e 100 μM), durante 46 horas.

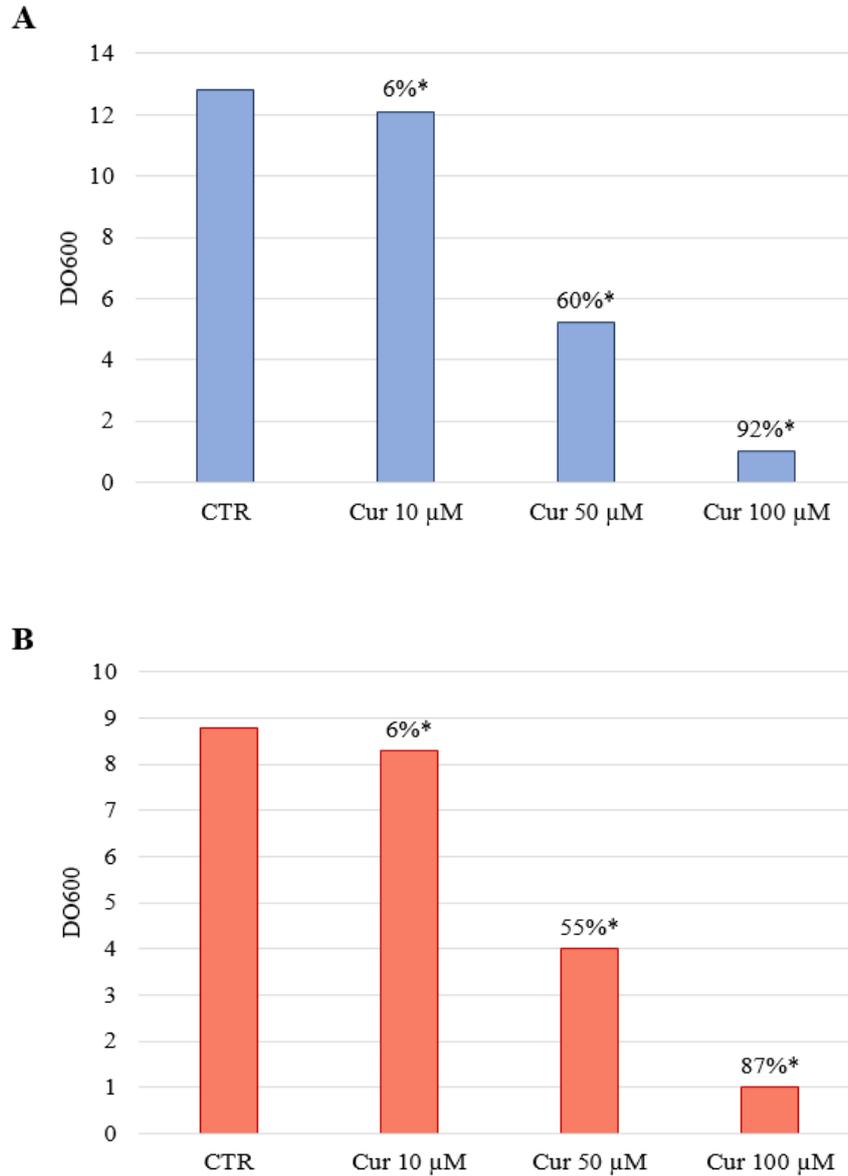


Figura 3. Taxa de inibição do crescimento de culturas da levedura *S. pombe* exposta à diferentes concentrações de curcumina. As células da cepa selvagem *wt* (A) e mutante *cta4Δ* (B) foram cultivadas em meio líquido YES na presença de 10, 50 e 100 μ M de curcumina durante 22h. * indica os valores de porcentagem referentes à taxa de inibição da curcumina para cada tratamento, com média para 2 ensaios.

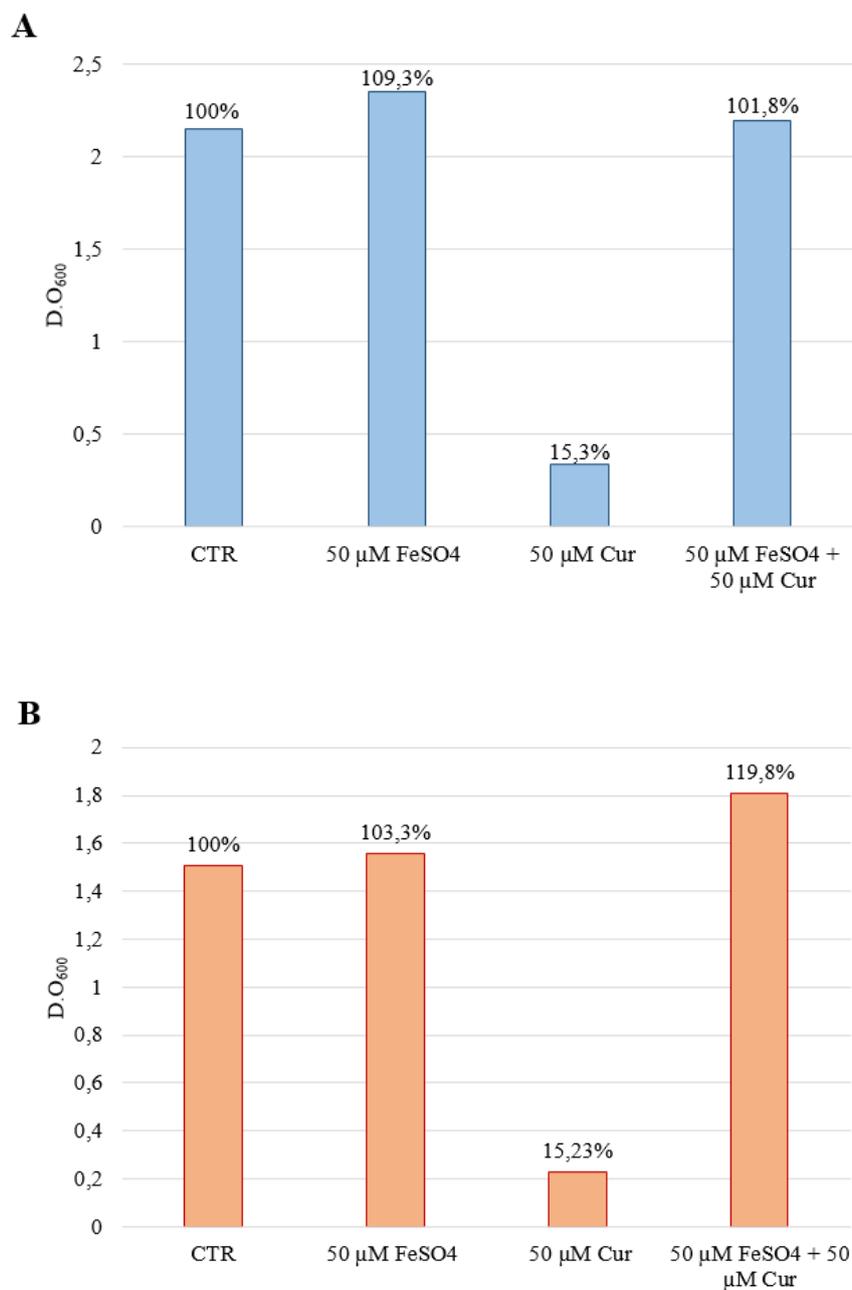


Figura 4. Adição de FeSO₄ reverte o efeito inibitório causado pela curcumina no cultivo de *S. pombe*. As células da cepa selvagem *wt* (A) e mutante *cta4Δ* (B) foram cultivadas em meio líquido YES na presença de 50 μM de curcumina e 50 μM de FeSO₄ durante 16h. Dados referentes a 3 ensaios.

4.1.2 Ensaio no meio sólido

Para confirmar os dados obtidos a partir da curva de crescimento de levedura em meio líquido, avaliamos também o efeito de curcumina em meio sólido. É possível observar no teste de diluição seriada (Figura 5A) que células mutantes *cta4Δ* são mais sensíveis já na presença de 10 μM curcumina, apresentando baixo crescimento de colônias ao ser comparado ao controle *wt*. Forte redução de crescimento de *cta4Δ* foi observada na presença de 100 μM . A adição do FeSO_4 , nas concentrações de 50 e 100 μM , reverteu consideravelmente o efeito inibitório da curcumina para as duas cepas (Figura 5A). A visualização deste fenômeno também foi possível através do microscópio óptico em que o tratamento com 100 μM de curcumina apresentou número reduzido de células, em relação ao grupo controle e, após a adição de FeSO_4 , o número de células aumenta em culturas *wt* e *cta4Δ*.

As imagens obtidas através do microscópio óptico para o grupo controle das cepas *wt* e *cta4Δ* demonstram a morfologia típica das células *S. pombe*, em que as células apresentam formato de bastonete e septos regulares (Figura 5B). O tratamento com 100 μM de curcumina promoveu alteração na morfologia e polaridade das células, tornando-as atípicas, com morfologia incomum e, também, alterações na citocinese como presença de células multisseptadas, sugerindo que a curcumina possa estar interferindo na distribuição e dinâmica de microtúbulos. É possível observar que alterações em morfologia e polaridade celular causadas pela curcumina foram revertidas pela adição de FeSO_4 , e as células *wt* novamente apresentam morfologia padrão em forma de bastonete. No caso de mutante *cta4Δ*, as células deixaram de formar aglomerados e não estão mais agrupadas, podendo ser observadas isoladamente, indicando que a suplementação com FeSO_4 amenizou tanto os defeitos da polaridade como da parede celular, característicos dessa cepa mutante (Figura 5B).

Ao compararmos o cultivo em meio líquido e em meio sólido, observamos que em concentrações mais altas de curcumina (100 μM) as células da mutante *cta4Δ* são mais sensíveis que *wt* (setas – Figura 5A). Em meio líquido, as leituras foram realizadas após 22 horas de cultivo, entretanto, em meio sólido as culturas permaneceram por 96 horas até a observação. Em cultivos mais prolongados notamos que as defesas de *cta4Δ* contra os efeitos da curcumina não são bem sucedidas como *wt*, visto que células mutantes já apresentam diversos problemas resultantes da deleção da Cta4 ATPase, como perturbações na homeostase iônica e o estresse do retículo endoplasmático.

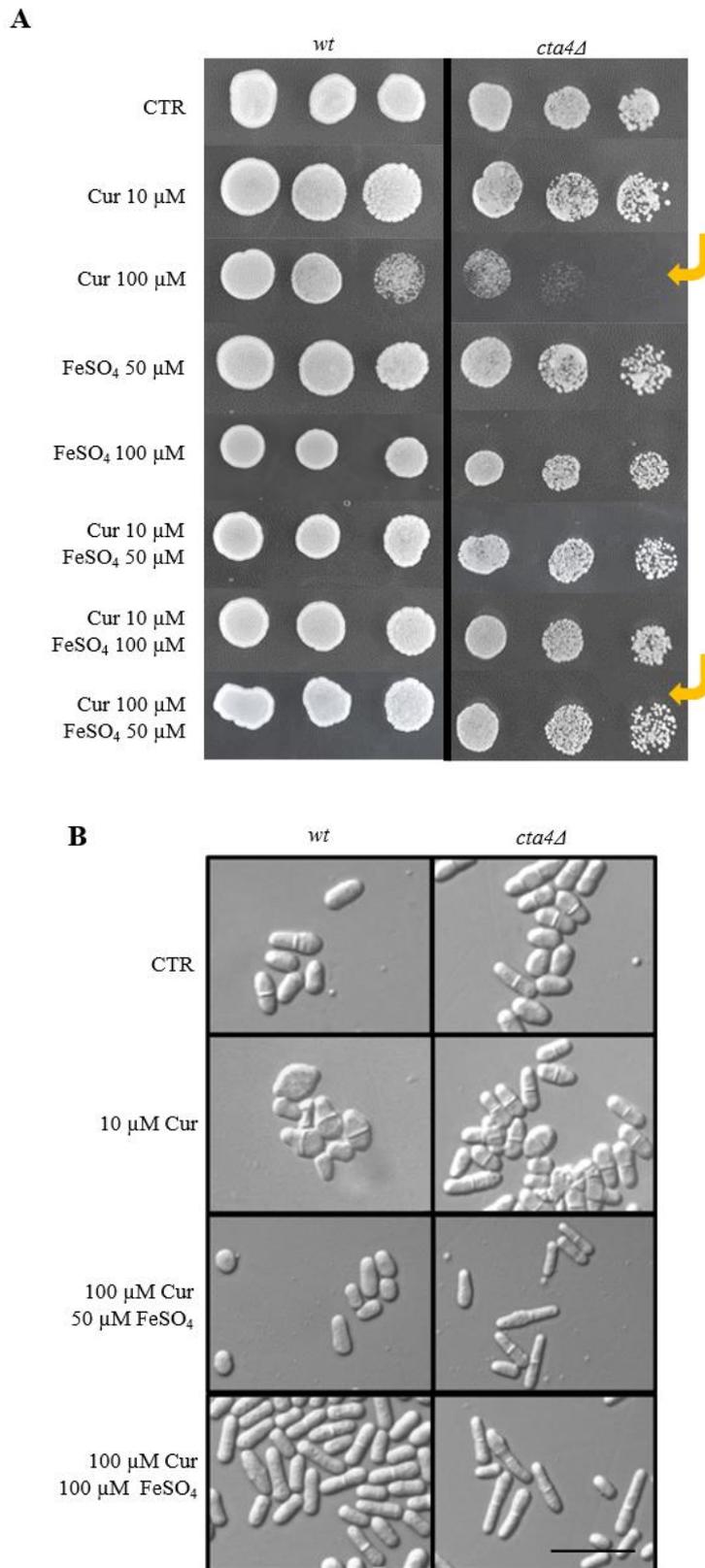


Figura 5. Efeito da curcumina e ferro no crescimento e morfologia das células de *S. pombe*. (A) Imagens das colônias das cepas *wt* e *cta4Δ* após teste de diluição seriada (diluição final 125x) em meio sólido YES na presença de 10 e 100 μM de curcumina e 50 e 100 μM de FeSO₄. (B) DIC demonstrando efeito de curcumina na polaridade celular e citocinese. As placas foram cultivadas por 72 h (*wt*) e 96 h (*cta4Δ*) e as células foram retiradas da placa em uma alíquota para visualização ao microscópio (objetiva 63×). Barra representa 10 μM.

4.2 Efeito da curcumina na organização de vacúolos em células *S. pombe*

A análise morfológica e quantitativa de vacúolos com sonda fluorescente CMAC, revelou que culturas de células de *wt* sem tratamento apresentaram vacúolos arredondados, em sua maioria grandes, bem delimitados, com média de $4,3 \pm 0,3$ (média \pm erro padrão) vacúolos por célula (Figura 6A). A princípio o número de vacúolos não foi significativamente alterado pela adição de $50 \mu\text{M FeSO}_4$, observa-se apenas uma variação de leve aumento para $6,3 \pm 0,3$ vacúolos/célula em *wt*, também não houve alteração na morfologia vacuolar (Figura 6B). Notavelmente, quando exposta à $50 \mu\text{M}$ curcumina, a cepa *wt* apresentou vacúolos menores, arredondados e com aumento de 2,4 vezes no número médio de vacúolos/célula (Figura 6C). Esse efeito foi parcialmente revertido em cultivos na presença concomitante de $50 \mu\text{M FeSO}_4$ e $50 \mu\text{M}$ curcumina, onde as células apresentaram vacúolos arredondados, bem delimitados, em tamanho maior e menos numerosos. O número médio de vacúolos por célula foi restaurado para $7,8 \pm 0,4$ (Figura 6D).

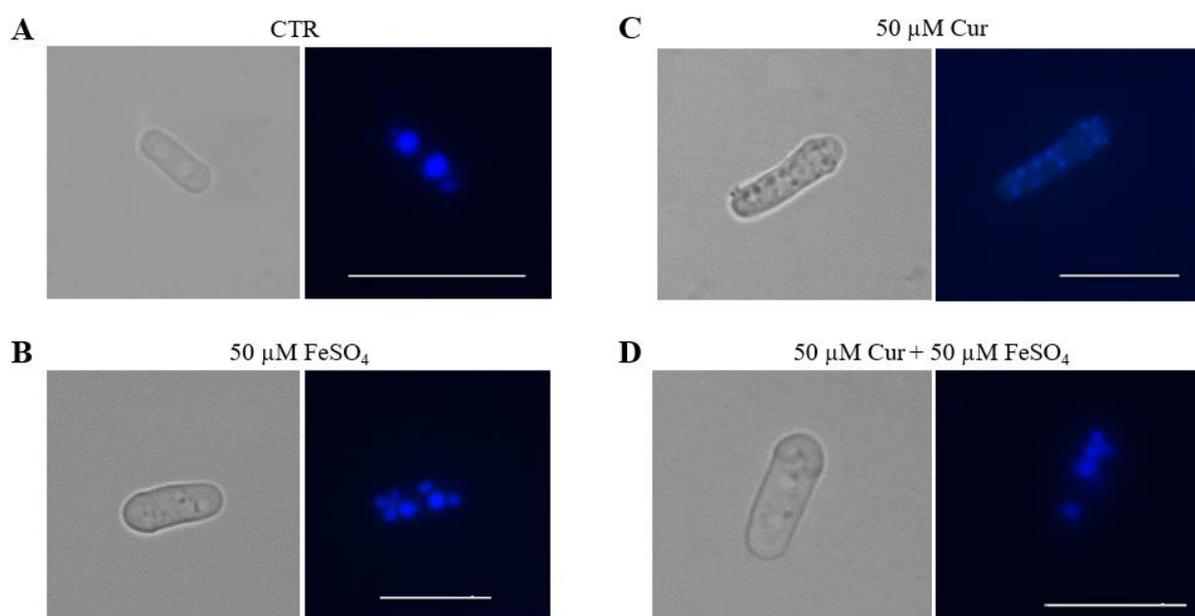


Figura 6. Marcação do lúmen vacuolar em células *wt* de *S. pombe* com sonda fluorescente CMAC. (A) Vacúolos em *wt* sem tratamento, (B) após cultivo na presença de $50 \mu\text{M FeSO}_4$, (C) na presença de $50 \mu\text{M}$ curcumina e (D) na presença concomitante de $50 \mu\text{M}$ curcumina e $50 \mu\text{M FeSO}_4$. As células foram analisadas após 16 horas de cultivo. Barras representam $10 \mu\text{M}$.

Diferentemente de células selvagens *wt*, observamos os vacúolos muito pequenos e, por diversas vezes, sobrepostos, em células mutantes *cta4Δ*, com média de $20,4 \pm 2,2$ vacúolos por célula (Figura 7A). A adição de $50 \mu\text{M FeSO}_4$ resulta em alterações na média de vacúolos por

célula, observa-se uma variação para $13,7 \pm 1,0$ vacúolos/célula em *cta4Δ*. Todavia, ocorreu mudança na morfologia com vacúolos pouco maiores, mais definidos e arredondados (Figura 7B). No tratamento com curcumina 50 μ M para a cepa *cta4Δ*, foi possível observar vacúolos fragmentados, muito pequenos e sobrepostos, ocupando grande parte do citoplasma, dificultando uma quantificação precisa. Foi viável quantificar em média $30,7 \pm 2,1$ vacúolos/célula, entretanto, fica claro o aumento no número médio de vacúolos (Figura 7C). O tratamento com FeSO₄ 50 μ M + 50 μ M curcumina, para *cta4Δ* foi semelhante ao observado para células *wt*, com vacúolos arredondados, bem delimitados, em tamanho maior e menos numerosos, com o número médio de vacúolos por célula restaurado para $13,3 \pm 1,4$ (Figura 7D), bem próximo dos números obtidos no controle.

A quantificação de vacúolos com sonda CMAC revela que curcumina promove a fragmentação vacuolar, indicando perturbações no processo de fusão/fissão de organela, e que este processo requer íons de ferro. A reversão parcial do efeito de curcumina pela adição de FeSO₄, sugere que a curcumina perturba a homeostase de outros íons, além do ferro, requeridos para fusão vacuolar, e/ou outros alvos moleculares requeridos para homeostase vacuolar. Há uma clara distinção na organização de vacúolos entre células selvagens que estão expressando P5A Cta4 ATPase (*wt*) e aquelas deficientes desse transportador. A ausência do gene *cta4*⁺ resulta em vacúolos altamente fragmentados com defeito em tamanho, indicando importância da Cta4 ATPase não somente em níveis de cálcio e na homeostase da organela onde reside, no retículo endoplasmático, mas também na homeostase de vacúolo e seu pH. É notável que a presença de curcumina e a ausência de Cta4 ATPase resultam em fenótipo semelhante de fragmentação vacuolar.

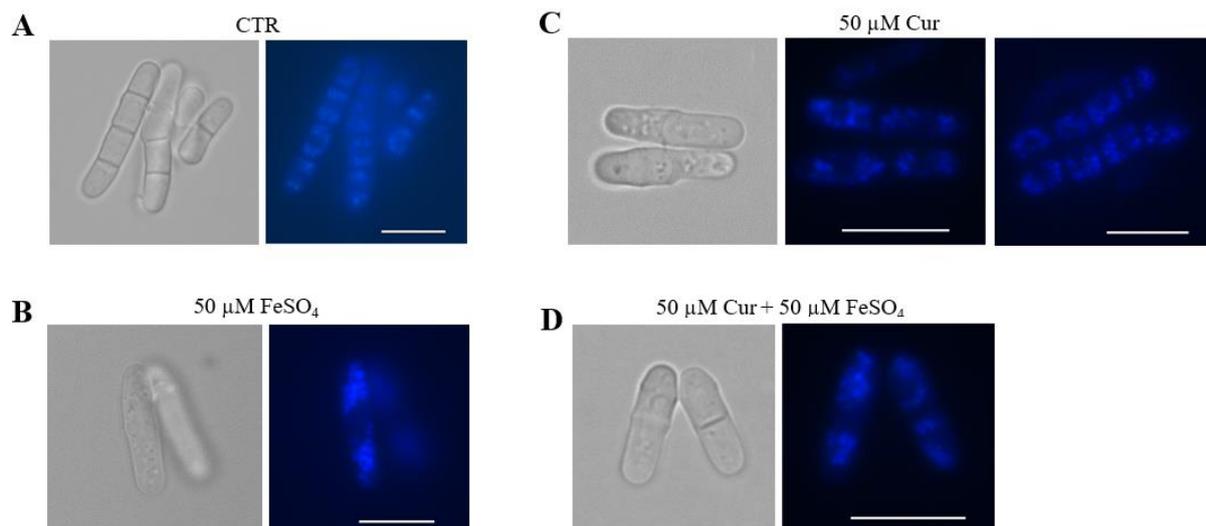


Figura 7. Marcação do lúmen vacuolar em células *cta4Δ* de *S. pombe* com sonda fluorescente CMAC. (A) Vacúolos em *wt* sem tratamento, (B) após cultivo na presença de 50 μM FeSO_4 , (C) na presença de 50 μM curcumina e (D) na presença concomitante de 50 μM curcumina e 50 μM FeSO_4 . As células foram analisadas após 16 horas de cultivo. Incubação com sonda foi realizada conforme descrito em Métodos. Barras representam 10 μM .

Nas análises realizadas com a sonda fluorescente MDY-64, que marca especificamente a membrana vacuolar, não foi possível identificar vacúolos nos tratamentos controle e 50 μM curcumina, tanto para células *wt* quanto para *cta4Δ* (Figura 8). Nos tratamentos com 50 μM FeSO_4 a morfologia vacuolar observada foi semelhante à descrita com a sonda fluorescente CMAC, vacúolos grandes e arredondados em *wt* (Figura 9A), com média de $7,7 \pm 0,6$ vacúolos/célula e, pequenos e sobrepostos em *cta4Δ* (Figura 9B), com média de $16 \pm 7,9$ vacúolos/célula. Os vacúolos observados após cultivo na presença de 50 μM FeSO_4 + 50 μM curcumina apresentaram morfologia arredondada para as duas cepas, porém em *wt* são maiores e em menor número (Figura 9C) que em *cta4Δ* (Figura 9D), com a média de vacúolos/célula de $8,5 \pm 0,8$ e $9,8 \pm 2,5$ para *wt* e *cta4Δ*, respectivamente.

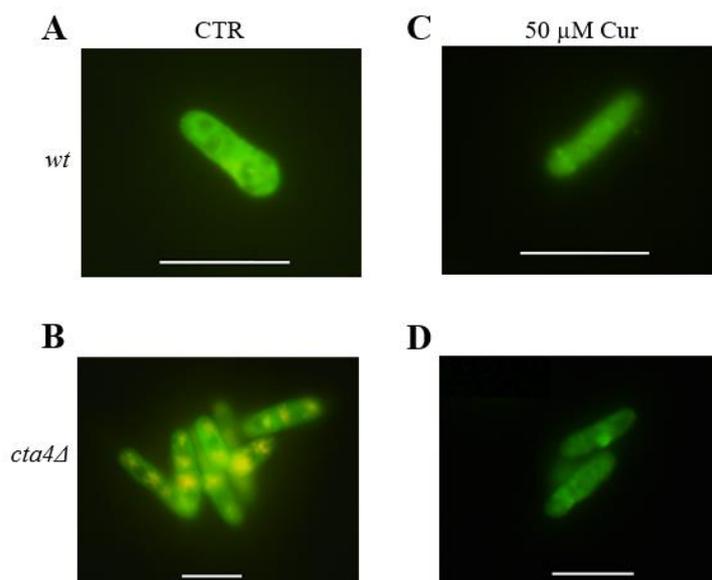


Figura 8. Marcação de vacúolos com a sonda fluorescente MDY-64 em células de *S. pombe* cultivadas na ausência e presença de curcumina. (A) *wt* e (B) *cta4Δ* sem tratamento (controle). (C) *wt* e (D) *cta4Δ* expostas à curcumina. As células foram incubadas com marcador após 16 horas de cultivo conforme descrito em Métodos. Barras representam 10 μ M.

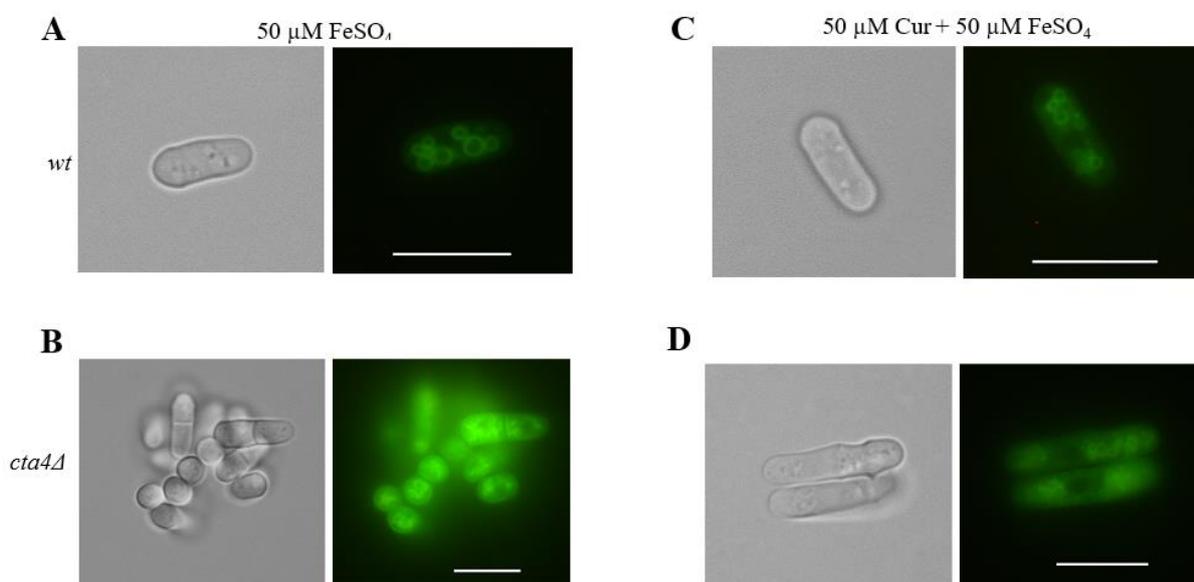


Figura 9. Marcação de vacúolos com sonda fluorescente MDY-64 em células de *S. pombe* cultivadas na presença de ferro e curcumina. (A) *wt* suplementada com FeSO_4 demonstra vacúolos grandes, arredondados e bem delimitados. (B) Vacúolos pequenos e sobrepostos em *cta4Δ* tratada com FeSO_4 . Tratamento com FeSO_4 + Curcumina resulta em vacúolos arredondados, bem delimitados em *wt* (C) e um pouco maiores em *cta4Δ* (D). As células foram analisadas após 16 horas de cultivo. Barras representam 10 μ M.

A fim de melhorar análises realizadas com as sondas fluorescentes CMAC e MDY-64 utilizamos uma terceira sonda fluorescente FM4-64. A análise morfológica e quantitativa de vacúolos marcados com a sonda FM4-64, após 1 hora de incubação, confirmou o observado pelas sondas anteriores, revelando que culturas sem tratamento apresentaram vacúolos arredondados, grandes e bem delimitados, com número médio de $4,9 \pm 0,2$ vacúolos/célula em *wt*, enquanto *cta4Δ* apresentou vacúolos pequenos e muito próximos uns dos outros, dificultando a quantificação, apresentou em média $13,4 \pm 0,9$ vacúolos/célula (Figura 10A - 10B). Tratamento com $50 \mu\text{M}$ FeSO_4 não revelaram alterações em vacúolos de *wt* apresentando média de $4,5 \pm 0,1$ vacúolos/célula, todavia houve diminuição em número de vacúolos/célula para *cta4Δ* com média de $8,4 \pm 0,7$. Nos tratamentos apenas com $50 \mu\text{M}$ curcumina, os vacúolos foram observados, arredondados, muito fragmentados e numerosos para as duas cepas, com médias de $10,7 \pm 0,4$ vacúolos/célula em *wt* (Figura 10C) e média de $19 \pm 1,4$ em *cta4Δ* (Figura 10D). Finalmente, cultivo na presença de $50 \mu\text{M}$ FeSO_4 + $50 \mu\text{M}$ curcumina, *wt* voltou a apresentar novamente morfologia vacuolar semelhante à observada no grupo controle, com vacúolos grandes e pouco numerosos (Figura 10E), e *cta4Δ* apresentou vacúolos pouco maiores e mais definidos, com médias de $4,1 \pm 0,2$ vacúolos/célula para *wt* e $8,6 \pm 0,7$ para *cta4Δ* (Figura 10F).

As amostras analisadas com apenas 15 minutos de incubação da sonda FM4-64 não revelaram marcação nos tratamentos com curcumina, indicando que a curcumina retarda a endocitose celular. A morfologia observada em 15 minutos para os demais tratamentos foi semelhante à observada em 1 hora. Na análise quantitativa foram contabilizados média de $4,3 \pm 0,2$ vacúolos/célula em *wt* e $8,4$ vacúolos/célula em *cta4Δ*, em amostras sem tratamento. Tratamentos com $50 \mu\text{M}$ FeSO_4 revelaram média de $4,1 \pm 0,3$ e $6,1 \pm 1,1$ vacúolos/célula em *wt* e *cta4Δ*, respectivamente.

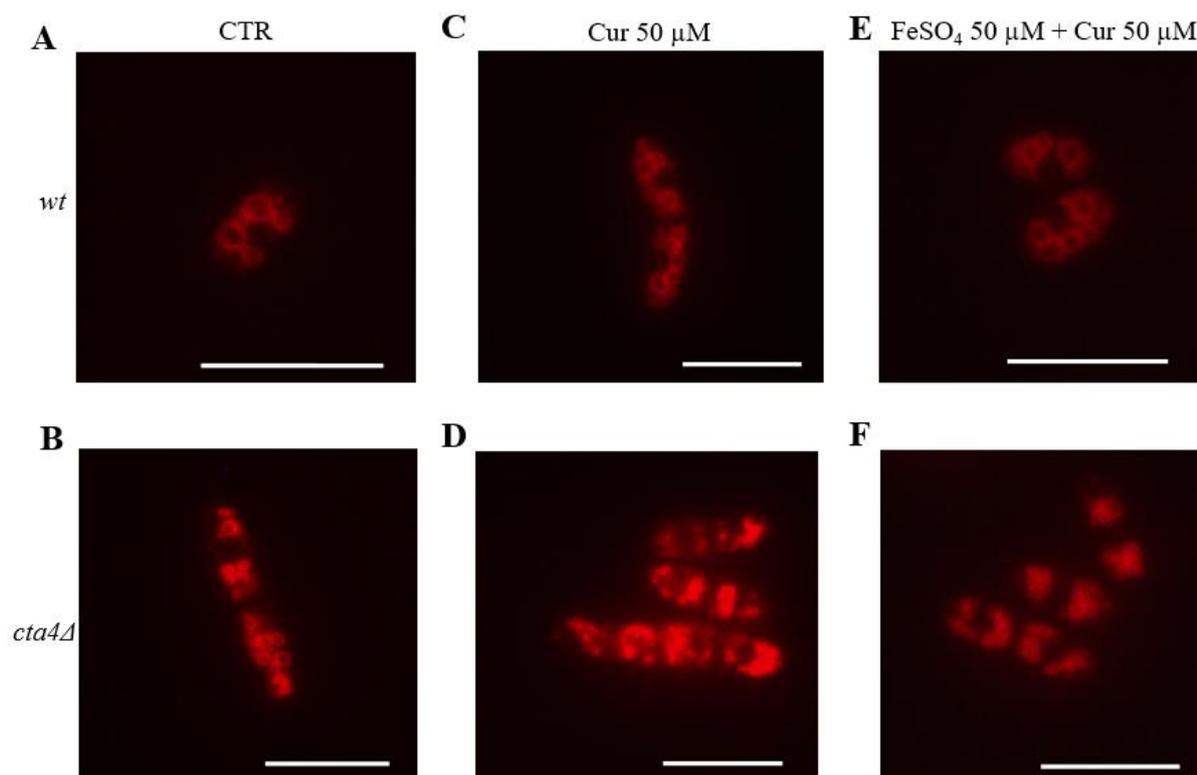


Figura 10. Marcação de vacúolos em células de *S. pombe* com a sonda fluorescente FM4-64. (A) Presença de vacúolos arredondados e grandes em *wt* sem tratamento. (B) Vacúolos numerosos e pequenos em *cta4Δ* sem tratamento. (C) Aumento no número de vacúolos de *wt* ao ser exposta à curcumina. (D) Fragmentação vacuolar em *cta4Δ* devido à exposição à curcumina, vacúolos muito pequenos e agrupados. Nos tratamentos com FeSO₄ + Curcumina, os vacúolos são novamente observados em tamanho grande e pouco numerosos em *wt* (E) e um pouco maiores, com melhor definição como no grupo controle em *cta4Δ* (F). As células foram analisadas após 16 horas de cultivo. Barras representam 10 μM.

A análise comparativa de marcação vacuolar com três sondas fluorescentes (Tabela 2) mostra que as sondas CMAC e FM4-64 apresentaram valores similares para *wt* nas condições controle e tratamento com curcumina, com 4,6 e 10,6 vacúolos/célula respectivamente; a curcumina causa intensa fragmentação vacuolar (aumento de 2,4 vezes). Este efeito pode ser revertido pela suplementação com FeSO₄.

Após a realização dos experimentos com os três marcadores seletivos, a sonda fluorescente FM4-64 foi a melhor, em virtude da melhor visualização e definição dos vacúolos, facilitando a quantificação das organelas.

A análise estatística realizada para a comparação da quantificação de vacúolos com a sonda de lúmen CMAC e a sonda de membrana FM4-64 está apresentada na Figura 11.

Tabela 2. Quantificação de vacúolos em células de *S. pombe* marcados com diferentes sondas fluorescentes.

Sonda fluorescente		
CMAC		
Tratamento	<i>wt</i>	<i>cta4Δ</i>
CTR	4,3 ± 0,3 (n=118)	20,4 ± 2,2 (n=39)
50 μM FeSO ₄	6,3 ± 0,3 (n=226)	13,7 ± 1,0 (n=83)
50 μM Cur	10,4 ± 0,4 (n=175)	30,7 ± 2,1 (n=38)
50 μM FeSO ₄ + 50 μM Cur	7,8 ± 0,4 (n=195)	13,3 ± 1,4 (n=39)
MDY-64		
Tratamento	<i>wt</i>	<i>cta4Δ</i>
CTR	nd	nd
50 μM FeSO ₄	7,7 ± 0,6 (n=47)	16 ± 7,9 (n=2)
50 μM Cur	nd	nd
50 μM FeSO ₄ + 50 μM Cur	8,5 ± 0,8 (n=37)	9,8 ± 2,5 (n=6)
FM4-64		
Tratamento	<i>wt</i>	<i>cta4Δ</i>
CTR	4,9 ± 0,2 (n=210)	13,4 ± 0,9 (n=69)
50 μM FeSO ₄	4,5 ± 0,1 (n=640)	8,4 ± 0,7 (n=49)
50 μM Cur	10,7 ± 0,4 (n=176)	19,0 ± 1,4 (n=31)
50 μM FeSO ₄ + 50 μM Cur	4,1 ± 0,2 (n=197)	8,6 ± 0,7 (n=60)

Os valores representam média ± erro padrão para quantificação de vacúolos; os valores com sonda FM4-64 correspondem a 1 hora de incubação; nd - não determinado; n - número total de células utilizadas para a quantificação dos vacúolos em cada tratamento.

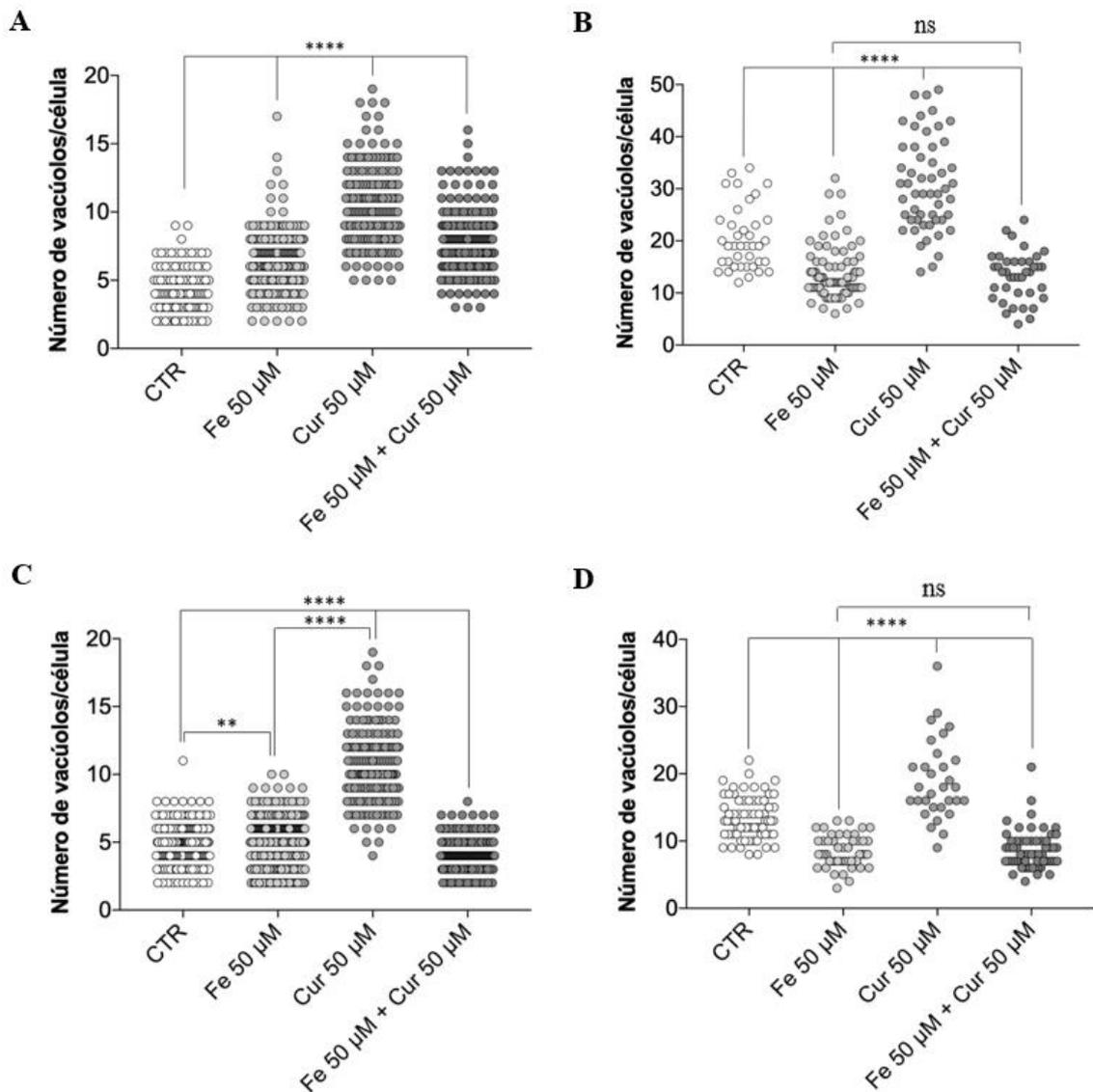


Figura 11. Análise estatística da quantificação de vacúolos com as sondas fluorescentes CMAC e FM4-64. Marcação com CMAC e FM4-64 em células *wt* (A e C) e em células *cta4* Δ (B e D). Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey de múltipla comparação com $p \leq 0,05$. ns - no significance ($p > 0,05$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

4.3 Análise do efeito de curcumina em mitocôndrias de células de *S. pombe*

O próximo passo foi analisar o efeito de curcumina nas mitocôndrias, devido sua importância na homeostase de ferro e na sinalização celular em sítios de contatos com vacúolos e retículo endoplasmático. A funcionalidade mitocondrial de células de *S. pombe* foi avaliada quando cultivadas na presença ou não de FeSO_4 e curcumina. Para isso, foi utilizada a sonda MitoTracker Red FM, que alcança as mitocôndrias de células vivas através de endocitose, dependente do potencial de membrana mitocondrial. É possível observar que nos tratamentos sem curcumina de *wt* e *cta4* Δ as mitocôndrias formam uma rede organizada por toda a célula

(Figura 12A – 12B). Nos tratamentos com 50 μM FeSO_4 este padrão foi mantido para a cepa *wt* (Figura 12C). Contudo, *cta4Δ* apresenta melhor organização mitocondrial na presença de FeSO_4 quando comparada ao controle (Figura 12D). Ao serem cultivadas com 50 μM curcumina, foi possível observar que o padrão de marcação mitocondrial foi totalmente perdido em ambas as cepas (Figura 12E – 12F). Quando expostas às 50 μM FeSO_4 juntamente com 50 μM curcumina, foi possível observar novamente a marcação em *wt*, mostrando as mitocôndrias e retículo mitocondrial organizadas em toda a célula (Figura 12G). Entretanto, para a cepa *cta4Δ* não foi possível observar marcação (Figura 12H).

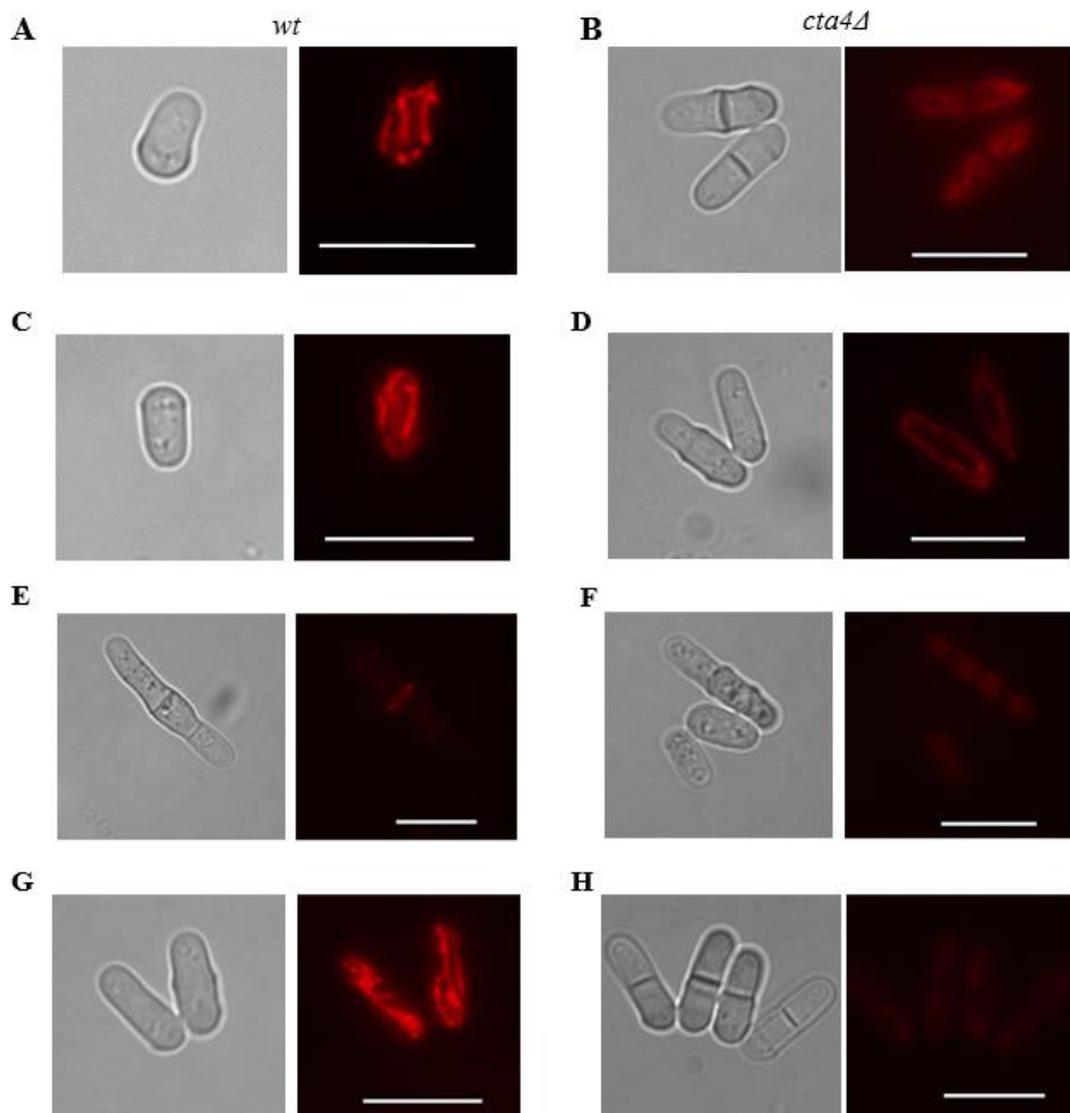


Figura 12. Organização de mitocôndrias de células de *S. pombe* marcadas com a sonda fluorescente MitoTracker Red FM. Imagens mostram células *wt* (A, C, E, G) e *cta4Δ* (B, D, F, H) cultivadas sem tratamentos (controle, A e B), na presença de FeSO_4 (C e D), na presença de curcumina (E e F), e expostas à curcumina e FeSO_4 (G, H). Barras representam 10 μM .

4.4 Análise da expressão de ATP13A1

Com intuito de obter maior entendimento do papel de P5A ATPase em células eucarióticas, especificamente em humanos, realizamos a análise da expressão do gene humano ATP13A1, que codifica para enzima homóloga a Cta4 ATPase de *S. pombe*, usando ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos. Os dados obtidos em plataformas UALCAN e Gtex mostram a distribuição da expressão do ATP13A1 em 31 tipos de tecidos do corpo humano (Figura 12), onde os níveis variam entre 10 e 90 transcritos por milhão, sendo pouco expresso no ventrículo esquerdo, do tecido cardíaco, e com expressão maior em baço.

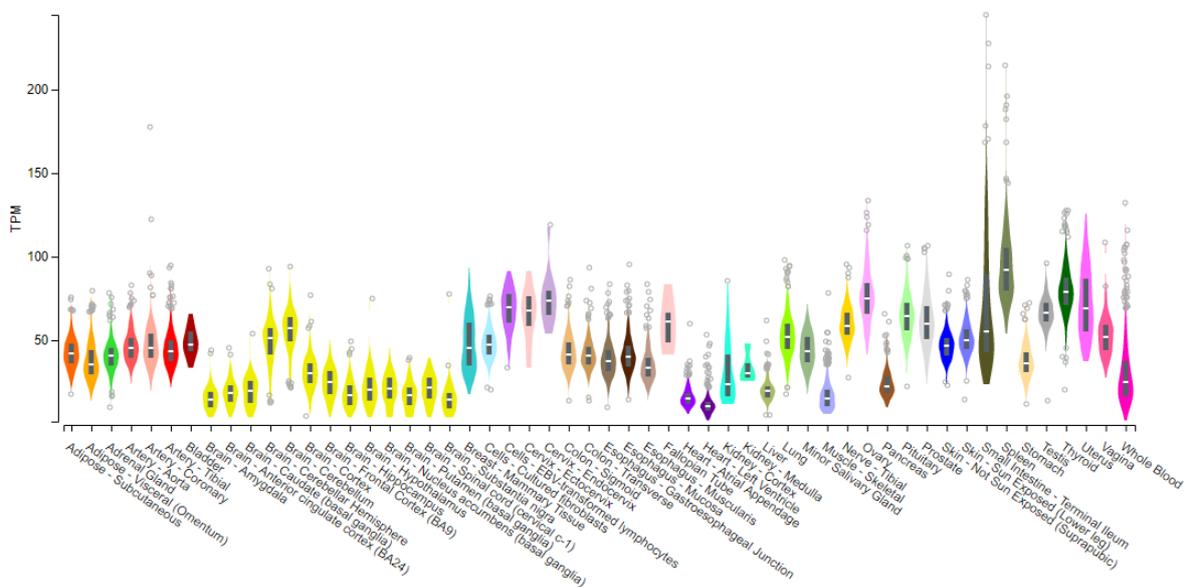


Figura 13. Expressão gênica do gene humano ATP13A1, que codifica para enzima homóloga Cta4 ATPase da levedura de fissão. A Análise foi realizada utilizando ferramenta Gtex.

Prosseguimos análise para tecidos tumorais, onde observamos que a expressão do gene ATP13A1 é elevada em diversos tipos de tumores, como carcinoma de esôfago, câncer mama, câncer pulmonar, e com maior diferença na expressão em tumores relacionados com os ductos biliares (Figura 13).

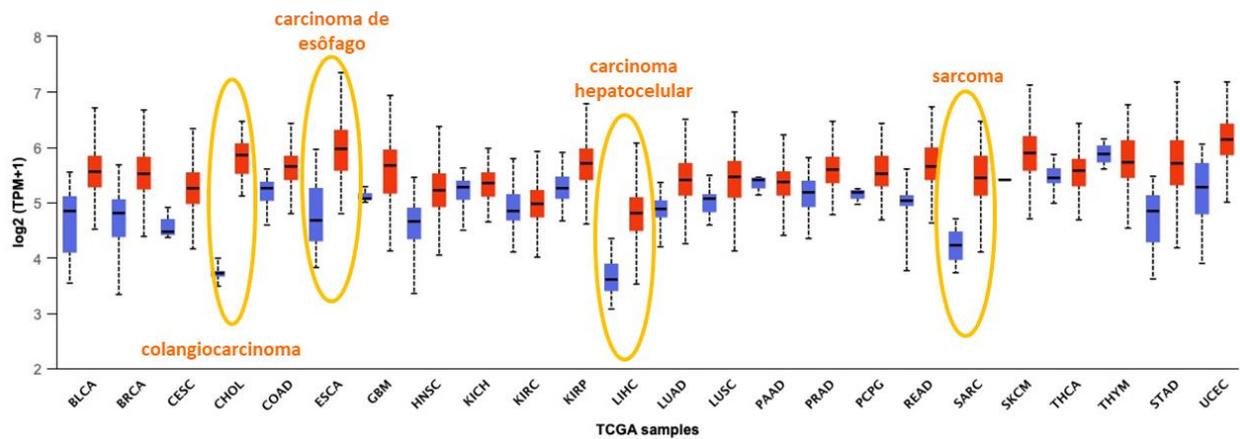


Figura 14. Expressão do gene humano ATP13A1 em diversos tipos de tumores. A análise foi realizada usando ferramenta UALCAN e bancos TCGA. A cor azul representa a expressão em tecidos saudáveis, a cor vermelha representa a expressão em diversos tipos de tumores. Abreviações: BLCA – Carcinoma de bexiga, BRCA – Carcinoma de mama, CESC – Carcinoma de células escamosas cervicais, CHOL – Colangiocarcinoma, COAD – Adenocarcinoma de cólon, ESCA – Carcinoma de esôfago, GBM – Glioblastoma multiforme, HNSC – Carcinoma de cabeça e pescoço, KICH – Cromóforo renal, KIRP – Carcinoma papilar de células renais, LIHC – Carcinoma hepatocelular, LUAD – Adenocarcinoma pulmonar, LUSC – Carcinoma pulmonar de células escamosas, PAAD – Adenocarcinoma de pâncreas, PRAD – Adenocarcinoma de próstata, PCPG – Feocromocitoma e paraganglioma, READ – Adenocarcinoma retal, SARC – sarcoma, SKCM – Melanoma cutâneo, THCA – Carcinoma de tireoide, THYM – Timoma, STAD – Adenocarcinoma de estômago, UCEC – Carcinoma endometrial.

Estendemos a análise para rede de interações de ATP13A1, via GeneMANIA (Figura 14), com intuito de elucidar sua rede de interações genética e proteína-proteína (física, co-localização, co-expressão). Destacamos “interactors” da homeostase de cálcio, como Ca^{2+} -ATPase ATP2C1 e ATP2C2, chaperona Ca^{2+} -dependente calnexina (CANX), que atua em processo de apoptose induzida por estresse do RE. As proteínas fornecidas pela rede de interação de ATP13A1 são especificadas na Tabela 3.

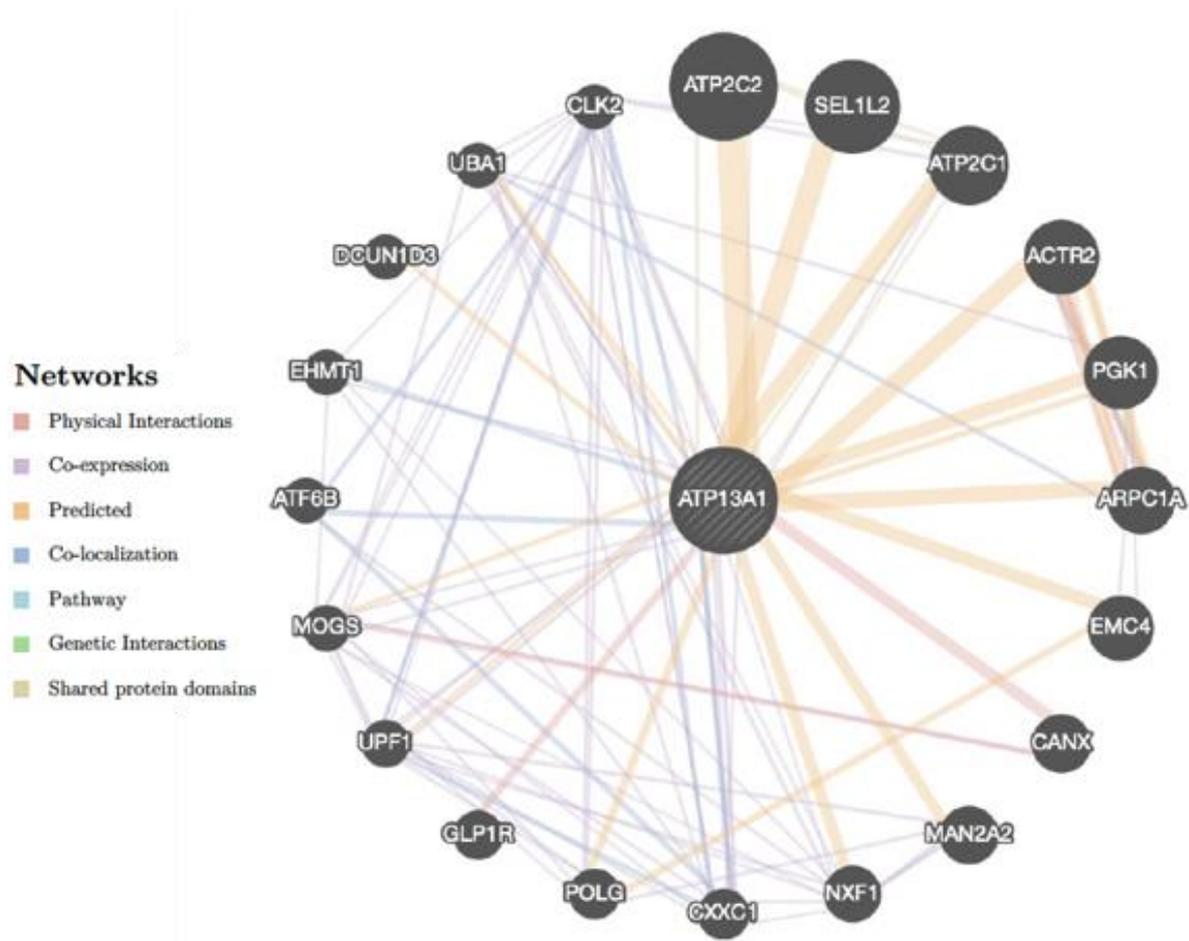


Figura 15. Rede de interação da P5A ATPase de humanos codificada pelo gene ATP13A1. A rede foi construída usando plataforma GeneMANIA. Cada tipo de interação está representado por cores diferentes.

Tabela 3. Genes identificados na rede de interações com a P5A ATPase ATP13A1.

Gene	Descrição/Nome	Identificação HGNC*
ATP13A1	ATPase 13A1	24215
ATP2C2	Ca ²⁺ -ATPase da via secretória 2	29103
SEL1L2	Subunidade adaptadora da ERAD E3 ligase	15897
ATP2C1	Ca ²⁺ -ATPase da via secretória 1	13211
ACTR2	ARP2 homólogo da proteína relacionada com actina 2 (levedura)	168
PGK1	Fosfoglicerato quinase 1	8896
ARPC1A	Subunidade 1A do complexo da proteína relacionada com actina 2/3	703
EMC4	Subunidade 4 do complexo de proteínas de membrana de retículo endoplasmático (RE)	28032
CANX	Calnexina	1473
MAN2A2	a-mannosidase membro 2 da classe 2A	6825
NXF1	Fator nuclear 1 de exportação de RNA	8071
CXXC1	Proteína 1 tipo CXXC finger	24343
POLG	Subunidade catalítica da DNA polimerase g	9179
GLP1R	Receptor do peptídeo semelhante a glucagon 1	4324
UPF1	RNA helicase e ATPase	9962
MOGS	Mannosil-oligosacarídeo glucosidase	24862
ATF6B	Fator de ativação de transcrição 6 b	2349
EHMT1	metiltransferase 1 de lisina de histona eucromatina	24650
DCUN1D3	Proteína defeituosa em nedilação de culina 1 contendo domínio 3	28734
UBA1	Enzima 1 de ativação do modificador semelhante à ubiquitina	12469
CLK2	Quínase 2 CDC semelhante	2069

* HGNC, Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee.

5 DISCUSSÃO

As leveduras têm sido amplamente utilizadas como organismos modelo devido ao alto grau de homologia com os genes humanos e conservação de vias de sinalização, fácil manipulação genética e exigências simples para cultivo em laboratório, se tornando fortes aliadas na compreensão dos mecanismos associados às diversas doenças como neurodegeneração, envelhecimento e câncer. Neste trabalho utilizamos a levedura de fissão *S. pombe* para compreender melhor os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo potencial antitumoral, antioxidante e anti-inflamatório de curcumina. Realizamos análise com ênfase em crescimento, morfologia celular e a distribuição de organelas como vacúolos e mitocôndria. Inicialmente, foi demonstrada que a toxicidade da curcumina ocorre de maneira dose dependente. O cultivo de células de *S. pombe* na presença de curcumina 10, 50 e 100 μM foi reduzido em 6%, 60% e 92% para *wt* e 6%, 55% e 87% para *cta4Δ*. Minear e colaboradores (2011) apresentaram resultados semelhantes no cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, em que 100 μM de curcumina reduziu o crescimento em aproximadamente 60%, após 7 horas de incubação.

Zhou e colaboradores (2020) testaram a curcumina em células de câncer de mama, nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-468 e obtiveram 40% de inibição no crescimento e proliferação celular em tratamentos com 40 μM de curcumina, por 72 horas. Resultados obtidos por Shen e colaboradores (2020), apresentaram a taxa de inibição de cerca de 50% em células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) expostas à 30 μM de curcumina, por 24 horas. Ghasemi e colaboradores (2019) apresentaram resultados semelhantes no cultivo de células de câncer cervical Hella, em que 70 μM de curcumina inibiu 70% do cultivo após 24 horas de exposição. Resultados obtidos por Watson e colaboradores (2010), demonstram que 20 μM de curcumina inibiram a proliferação em até 50% de células de câncer de cólon humano (HCT-116 e HT29), aumentando a concentração para 40 e 80 μM a taxa de inibição alcança cerca de 70% e 84%, respectivamente, após 72 horas de incubação. Jahanshiri e colaboradores (2012) apresentaram resultados semelhantes com o fungo *Aspergillus parasiticus*, em que 125 a 2000 $\mu\text{g/ml}$ de curcumina inibiu de 34 a 60% no crescimento e proliferação celular. Nos resultados obtidos por Neelofar e colaboradores (2011), culturas de *Candida albicans* expostas à 50 μM de curcumina tiveram a taxa de inibição de 40% no crescimento e proliferação celular, até 24 horas, enquanto para *Candida glabrata*, a taxa de inibição foi de 30% em 50 μM de curcumina.

Concentrações de 10 μM de curcumina não revelaram diferença significativa na inibição do crescimento e divisão celular em *S. pombe*, esta diferença foi observada em concentrações a partir de 50 μM . Apesar de sofrer alterações no cultivo, a levedura de fissão apresenta mecanismos que permitem a resistência às doses mínimas da curcumina. Estes resultados corroboram com os obtidos por Borges e colaboradores (2020), que apresentaram diferença estatística significativa na proliferação de células tumorais em tratamentos a partir de 50 μM de curcumina.

As células de *S. pombe* cultivadas na presença de curcumina, também apresentaram morfologia anormal, sendo alongadas ou arredondadas, multisseptadas e perdendo sua forma de bastonete. Além de aberrantes, também apresentaram aglomerados que sugerem provável alteração da parede celular. Resultados obtidos por Minear e colaboradores (2011) igualmente demonstraram alterações nos padrões morfológicos nas células de *S. cerevisiae* expostas à curcumina, em que apresentaram diminuição na formação de brotos e aumento na fração de células não aglomeradas, características do aumento no cumprimento da fase G_1 do ciclo celular.

Os testes realizados por Rangel-Castañeda e colaboradores (2018) utilizando *Entamoeba histolytica*, demonstraram que 100 μM de curcumina causou alteração na adesão e morfologia de trofozoítos em células incubadas por 6 horas, revelando danos na membrana, alterações de tamanho e perda da integridade celular. Resultados semelhantes foram obtidos por Gutiérrez-Gutiérrez (2017) em células de *Giardia lamblia* em que a exposição à baixas doses de curcumina (0,3 μM) resultou em danos e alterações morfológicas nos flagelos ventrolateral e caudal, além do surgimento de saliências e bolhas na superfície dorsal e ventral (3 μM de curcumina). Em tratamentos com 15 μM de curcumina 80% das células perderam sua morfologia normal.

A morfologia celular está relacionada com a dinâmica de microtúbulos, estes são responsáveis pela organização do conteúdo celular e pela reorganização durante o ciclo celular (AKHMANOVA; STEINMETZ, 2008; DESAI; MITCHISON, 1997). A dinâmica dos microtúbulos é controlada por mecanismos que envolvem o crescimento estocástico e o encolhimento das extremidades intrínsecas do polímero, assim como proteínas associadas aos microtúbulos, as MAPs (BOWNE-ANDERSON; HIBBEL; HOWARD, 2015). Nossos dados mostram que as alterações morfológicas observadas nas células de *S. pombe* indicam que a curcumina, possivelmente, interfere na dinâmica de microtúbulos e citoesqueleto, culminando em problemas na citocinese.

Alguns estudos demonstraram que a curcumina é um composto biologicamente ativo e quelante de ferro que induz a morte de diversos tipos celulares causando carência de ferro pela redução do *pool* intracelular (JIAO et al., 2009). Neste contexto, testamos os efeitos da curcumina em culturas de *S. pombe* suplementadas com FeSO₄ e foi possível observar que sua adição reverte as alterações morfológicas, e no crescimento e proliferação celular, resultantes da exposição à curcumina, sugerindo que o composto causa defeitos na homeostase do ferro e, células de *S. pombe*. Azad e colaboradores (2013) relataram que a suplementação de ferro antagoniza os efeitos causados pela curcumina em células de *S. cerevisiae*, recuperando o fenótipo de crescimento normal e diminuindo o efeito fisiológico da curcumina. Resultados semelhantes foram obtidos por Minear e colaboradores (2011) em que 50 µM de FeSO₄ melhorou significativamente o crescimento de todas as cepas de *S. cerevisiae* testadas e restaurou a distribuição da morfologia celular. Resultados obtidos por Azad e colaboradores (2013) revelaram que culturas de *S. cerevisiae* recuperam a parada do ciclo celular, causada pela curcumina, após suplementação com ferro.

O ferro é um elemento essencial para o funcionamento correto de diversos processos que ocorrem nas células, como síntese de DNA, reações redox e ciclo celular (PUIG et al., 2017; ZHANG, 2014). Entretanto, altas concentrações de ferro também podem se tornar prejudiciais ao metabolismo e morfologia celular, visto que em ensaios realizados por Cogo e colaboradores (2020), no cultivo celular de *Yarrowia lipolytica* suplementadas com 1 ou 2 mM de FeSO₄, ocorreu diminuição na capacidade de formação de colônias e alterações morfológicas. Ao avaliarmos os efeitos do ferro na formação de colônias, em culturas de *S. pombe*, foi possível observar que baixas concentrações de FeSO₄ (50 µM) não resultaram em alterações na divisão e morfologia celular em *wt*, contudo, amenizaram os defeitos na polaridade e da parede celular de *cta4Δ*.

Nas leveduras, o ferro é armazenado nos vacúolos, auxiliando na manutenção do ferro citosólico (GOLLHOFER et al., 2014; BODE et al., 1995). Quando os níveis estão elevados no citoplasma, o ferro é importado para o vacúolo, protegendo a célula de sua toxicidade e armazenando para uso em condições de limitações de ferro (LI et al., 2001). Os vacúolos estão envolvidos em diversos processos importantes para as células como reserva de polifosfatos e poliaminas, e estabilidade de cátions como cálcio, ferro, cobre e cádmio (VESES; RICHARDS; GOW, 2008; KLIONSKY et al., 1990). Além disso, os vacúolos sofrem alterações em tamanho e número em resposta a diversos estímulos fisiológicos e ambientais (ARMSTRONG, 2010).

As mitocôndrias são organelas que também estão envolvidas com a homeostase do ferro celular, uma vez que são os principais centros de utilização e acúmulo de ferro (NIE et al.,

2005). Estas organelas utilizam o ferro para síntese e reparo do DNA, síntese de cluster ferro-enxofre essenciais para a manutenção de uma variedade de processos celulares e sistêmicos e, também, controlam o estresse oxidativo (PAUL et al., 2017; ROUAULT et al., 2016). A disfunção mitocondrial resultante de altas concentrações de ferro pode resultar em morte celular por ferroptose (CHEN et al., 2019).

Analizamos o efeito da curcumina na morfologia vacuolar em células de levedura de fissão, usando marcação “*in vivo*” com sondas fluorescentes. Foi possível observar que em culturas sem tratamento, *wt* apresentou vacúolos grandes e com média de 4,6 vacúolos por célula, enquanto *cta4Δ* apresentou vacúolos pequenos e sobrepostos, dificultando a quantificação, com média de 30,7 vacúolos por célula. Ao expor as culturas de *S. pombe* à curcumina, ocorreu interferência na dinâmica de fissão/fusão vacuolar para as duas cepas, resultando em intensa vacuolização nos tratamentos com 50 μM de curcumina, com o surgimento de diversos vacúolos pequenos, aumento no número médio de vacúolos por célula. Os vacúolos de *S. pombe* são caracterizados por serem numerosos, pequenos e aleatoriamente distribuídos por toda a célula e que sofrem alterações morfológicas rapidamente quando a célula está sujeita ao estresse (TAKEGAWA et al., 2003). Nossos resultados sugerem que a curcumina, possivelmente, afeta a fissão/fusão de vacúolos por meio do estresse resultante da perturbação na homeostase de ferro e/ou outros íons relevantes para o funcionamento normal dos processos celulares. Nos tratamentos com curcumina e suplementados com FeSO₄ 50 μM foi possível observar a dinâmica normal de vacúolos, como nos tratamentos controle, sustentando a hipótese de que a curcumina perturba a dinâmica vacuolar, reduzindo o *pool* intracelular de ferro.

Bone e colaboradores (1998) esclarecem que os vacúolos podem se fragmentar lentamente em resposta ao sal e alterações na osmolaridade, sendo que a fissão requer a via Sty1 e Pmk1. Resultados obtidos por Lee e colaboradores (2012) revelam que células de *S. cerevisiae* apresentam vacúolos com estrutura fragmentada no final da vida celular, uma vez que células em divisão celular normal, apresentam vacúolos que se fundem, originando um vacúolo grande, quando esta fusão falha, estruturas vacuolares fragmentadas são observadas na morte celular. Além disso, a fragmentação vacuolar também pode decorrer em função de desbalanço de cálcio celular. A primeira observação dessa relação foi realizada em mutante *pmr1* de *S. cerevisiae*, deficiente de Ca²⁺-ATPase de Golgi (homólogo do gene humano ATP2C, Tabela 3) que apresenta estresse do RE e níveis elevados de cálcio citoplasmático (KELLERMAYER et al., 2003). Desfougères e colaboradores (2016) explicam que a presença física da subunidade V0 da V-ATPase é necessária para a fusão vacuolar. Enquanto Coonrod e

colaboradores (2013) afirmam que a acidificação vacuolar induz a fusão vacúolo-vacúolo. Nesse contexto, nossos dados sugerem que a curcumina possa alterar o pH vacuolar, interferindo diretamente na fusão dos vacúolos, através de modulações na V-ATPase.

Para compreender melhor a resposta da célula à curcumina ainda são necessários mais testes. É preciso expor as culturas a concentrações mais baixas, como 10 μM de curcumina, possibilitando melhor observação das defesas que a célula utiliza para driblar os efeitos resultantes da exposição e garantir sua sobrevivência, assim como, encontrar a concentração a qual caracteriza o início dos efeitos obtidos até o momento.

A fim de obter resultado comparativo, utilizamos três marcadores seletivos, a sonda fluorescente CMAC que marca o lúmen vacuolar, MDY-64 e FM4-64 que marcam a membrana vacuolar. Os resultados obtidos com as três marcações foram semelhantes. A visualização dos vacúolos foi melhor realizada utilizando a sonda fluorescente CMAC, em relação a sonda fluorescente MDY-64, pois conferiu melhor resolução no número e definição dos vacúolos celulares. A sonda MDY-64 marcou outras estruturas celulares, além da membrana plasmática e, ainda, produziu background no interior da célula, dificultando a visualização dos vacúolos. A curcumina também produz autofluorescência que é captada pelo filtro utilizado para a sonda MDY-64. A sonda fluorescente FM4-64 demonstrou melhor marcação e definição dos vacúolos, facilitando a quantificação, sendo este o marcador seletivo de primeira escolha para experimentos futuros. Os tratamentos com Curcumina 50 μM e FeSO_4 50 μM + Curcumina 50 μM não marcaram vacúolos nos primeiros 15 minutos de incubação da sonda FM4-64, indicando que a curcumina retarda a endocitose celular. Os experimentos foram realizados com os três marcadores seletivos a fim de definir a melhor opção a ser utilizada nos ensaios futuros, uma vez que os mesmos já estavam disponíveis no laboratório, não sendo necessária sua aquisição.

Além dos vacúolos, as mitocôndrias são organelas de igual importância para a sobrevivência das células, visto que juntamente com o retículo endoplasmático formam uma rede de interações que desempenham funções cruciais como sinalização de cálcio, transporte de lipídeos, metabolismo energético (MALINA; LARSSON; NIELSEN, 2018) e homeostase de ferro (NAPIER; PONKA; RICHARDSON, 2005; MARTINS et al., 2018). Os sítios de contato retículo-mitocôndria são regiões de contato dinâmico entre as duas organelas, importante na manutenção de diversos processos biológicos e com ligação direta a doenças neurodegenerativas (XU; WANG; TONG, 2020). As mitocôndrias estão ligadas ao endossomos e fortemente amarrados ao retículo endoplasmático, possibilitando o tráfego entre organelas, mesmo em distâncias mais longas (FRIEDMAN et al., 2013; ZAJAC et al., 2013).

Considerando a importância da interação entre a mitocôndria e o retículo endoplasmático, bem como o ERE em células de *S. pombe*, causado pela curcumina, verificamos possíveis alterações mitocondriais em leveduras de fissão cultivadas na presença do composto. Vale ressaltar que a curcumina é um quelante de ferro, nesse sentido, avaliar as mitocôndrias é fundamental, uma vez que as mitocôndrias utilizam o ferro em seu metabolismo. Os resultados obtidos utilizando a sonda MitoTracker Red FM revelaram uma rede mitocondrial que se estende por todo o citoplasma das células, de maneira semelhante em *wt* e *cta4Δ*. Quando cultivadas com FeSO₄ não são observadas mudanças no padrão de distribuição de mitocôndrias pelo citoplasma celular de *wt*, contudo, em *cta4Δ* foi observada melhor organização da rede mitocondrial. Nas culturas expostas à curcumina não ocorre marcação de mitocôndrias com a sonda fluorescente, impossibilitando a visualização das mitocôndrias. Na tentativa de restaurar os padrões na rede mitocondrial, adicionamos 50 μM FeSO₄ concomitantemente à 50 μM de curcumina, ainda assim, não foi possível observar mitocôndrias. É possível que o efeito que a curcumina exerce nas mitocôndrias das células mutantes *cta4Δ* não seja restaurado pela suplementação com ferro, como ocorreu no caso de fragmentação de vacúolos. São necessários futuros estudos da funcionalidade de mitocôndrias para melhor compreensão deste fenômeno.

A sonda fluorescente MitoTracker Red FM marca as mitocôndrias de células vivas, alcançando as mitocôndrias por endocitose, dependendo do potencial de membrana mitocondrial. Sugerimos que uma possível explicação para a não marcação de mitocôndrias em culturas expostas à curcumina esteja relacionada com a morte da célula. Em células de câncer, a curcumina pode levar a morte por apoptose, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, induzindo as reações oxidativas e lise de membranas mitocondriais (AGARWAL et al., 2018; KHUNCHANDY; RAO, 1990). Sugerimos, também, que a curcumina possa afetar a rede endocítica, uma vez que a sonda fluorescente MitoTracker Red FM alcança a mitocôndria por meio de endossomos. Os endossomos se movimentam ativamente através dos microtúbulos. Em distâncias mais curtas (< 1 μm), os endossomos podem se movimentar através de zonas ricas em actina, enquanto em distâncias mais longas, essa translocação ocorre por meio de dineína até o centro da célula (ZAJAC et al., 2013; FLORES-RODRIGUEZ et al., 2011; NIELSEN et al., 1999). Resultados obtidos por Zhang e colaboradores (2020) revelaram que a curcumina reduziu a capacidade de migração e invasão celular, aumentando a apoptose, além de diminuir a remodelação do citoesqueleto em células de câncer de estômago (SGC-7901), induzindo a parada do ciclo celular na fase S. Portanto, sugerimos que a curcumina, possivelmente, interfere na dinâmica de microtúbulos, logo, também interfere no tráfego de

endossomos, sendo capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial, contudo, ainda não necessários estudos mais aprofundados para melhor compreensão dos mecanismos da curcumina.

Interessantemente, as mitocôndrias participam de uma rede que também integra os vacúolos. Quando há redução na acidez vacuolar o resultado é a disfunção mitocondrial, uma vez que os aminoácidos se acumulam no citoplasma, pois não são mais importados para os vacúolos. Consequentemente, a disfunção mitocondrial pode levar a uma redução da produção de grupos de ferro-enxofre (GOTTSCHLING; NYSTROM, 2017). Quando a curcumina altera o pH vacuolar, o resultado pode ser a disfunção mitocondrial. Vale ressaltar que um colapso no controle do pH vacuolar também pode levar a redução do potencial de membrana mitocondrial, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e perturbações no tráfego de vesículas (HUGHES; GOTTSCHLING, 2012; POZNIAKOVSKY et al., 2005; MACHIDA; TANAKA, 1999). Sugerimos que ao fragmentar vacúolos, a curcumina possa também levar à fragmentação dos endossomos, afetando toda a rede endocítica, sendo esta a provável explicação para a não marcação das mitocôndrias, pela sonda fluorescente, nos tratamentos com curcumina, já que há comprometimento endossomal. Além disso, nossos dados sugerem que o potencial de membrana mitocondrial possa ser reduzido com a exposição das culturas à curcumina, uma vez que este potencial é essencial para a sonda se acumular na mitocôndria. Indicamos, também, que a curcumina possa interferir na homeostase do cálcio, além do ferro, resultando em estresse do retículo endoplasmático, e, conseqüente, perturbação na rede de endomembranas e tráfego de vesículas. Observamos que a suplementação com ferro reverteu os efeitos causados pela curcumina em *wt*, contudo o mesmo não ocorreu em *cta4Δ*, uma vez que esta cepa apresenta perturbações graves na rede de endomembranas, resultante da deleção da *cta4* ATPase. Mesmo com a adição do sulfato de ferro não foi possível restaurar os efeitos causados pela deleção, pois este também necessita de passagem pela via endocítica.

No projeto inicial estavam previstos ensaios para avaliar a funcionalidade de vacúolos e mitocôndrias, através das ATPases (V-ATPase e F-ATP sintase), entretanto, a execução foi inviabilizada pela pandemia do SARS-CoV-2.

Para finalizar, a curcumina inibe a proliferação celular de *S. pombe*. Este efeito é mais evidenciado em células de *S. pombe* mutantes de *Cta4* ATPase. A cepa *cta4Δ* possui constante estresse do retículo endoplasmático devido à ausência do transportador P5A *Cta4* ATPase e alterações em níveis celulares de cálcio no citoplasma e organelas como RE, o que a torna mais sensível aos diversos fatores de estresse (OKOROKOVA-FAÇANHA et al., 2002, LUSTOZA et al., 2011).

Várias proteínas identificadas na rede de interações de ATP13A1 são proteínas do retículo endoplasmático, que são conhecidas como componentes da homeostase do RE (Ca²⁺-ATPases, glucosidade) e do complexo programa celular da resposta ao estresse do RE ou UPR (como calnexina e fator ATF6). O estresse do RE é desencadeado pelo acúmulo de proteínas não-enoveladas e/ou mal-enoveladas no RE, que pode ocorrer em função do aumento da demanda por síntese de proteínas, acúmulo de proteínas com mutações específicas ou de uma interferência fisiopatológica com funções do RE, como controle de níveis de Ca²⁺, glicosilação proteica ou estresse oxidativo. A resposta UPR constitui um mecanismo protetor da célula, as falhas neste mecanismo de “controle de qualidade” levam a apoptose e são bases de algumas doenças em humanos (HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). Vários estudos demonstraram que as proteínas de estresse do RE são reguladas positivamente em vários tipos de tumor, e foi sugerido que níveis elevados dessas são essenciais para a sobrevivência de células tumorais e evasão de apoptose (SCHÖNTHAL, 2009). Algumas terapias anticâncer tem como estratégia a sensibilização das células tumorais a quimioterápicos através da indução do estresse do RE. Destarte, a compreensão de mecanismos de sensibilização e de mecanismos que permitem adaptação a resposta UPR ao invés de culminar em apoptose, são de fundamental importância (RUTKOWSKY; KAUFMAN, 2007).

Os resultados obtidos na rede de GeneMania (Figura 15) juntamente com os dados de níveis elevados de ATP13A1 em diversos tumores (Figura 14), correlacionados com o conhecimento de que P5A ATPases de leveduras, Cta4p e Spf1p, são necessárias para manutenção da homeostase do RE e para estresse do RE, e que Cta4 ATPase regula níveis de cálcio no RE e citoplasma (LUSTOZA et al., 2011), indicam fortemente a importância da P5A ATPase ATP13A1 na resposta ao estresse do RE e sobrevivência dessas células tumorais. Estudos maiores (levantamento bibliográfico inicialmente) precisam ser realizados para entender a relação de ATP13A1 ATPase com proteínas nucleares como quinase CLK2, fatores nucleares, RNA helicase e metilase de modificação de histona/cromatina. Fosfoglicerato quinase 1 PGK1 e receptor do peptídeo semelhante a glucagon 1GLP1R relacionam ATP13A1 com controle metabólico da célula e vias glicolíticas.

A presença na rede de proteínas de ubiquitinação (UBA1, DCUN1D3, SEL1L2) levanta duas linhas de ponderação/explicação. A primeira consiste no fato de que a ubiquitinação de proteínas é necessária como marcação de proteínas mal-enoveladas e outras para degradação em proteassomos, como parte do sistema ubiquitina-proteassomo. A segunda é o papel sinalizador de ubiquitinação de proteínas em sítios de contato entre o RE e a mitocôndria (MAMs) e algumas proteínas da membrana externa de mitocôndria, em que a ubiquitinação

dessas proteínas controla a mitofagia (DURCAN; FON, 2015). Ainda, os fluxos de Ca^{2+} do RE para a mitocôndria ocorrem em MAMs (HERRERA-CRUZ; SIMMEN, 2017; LEVINE; PATEL, 2016); células de câncer têm MAMs alterados. É possível que ATP13A1 participe juntamente com outros transportadores de Ca^{2+} , em controle de fluxos de Ca^{2+} em MAMs e/ou sua localização fica enriquecida em MAMs. Além do papel em homeostase de cálcio mitocondrial, as MAMs são importantes para acoplar a replicação de DNA mitocondrial com divisão mitocondrial (LEWIS; UCHIYAMA; NUNNARI, 2016). Notavelmente, a DNA polimerase gamma (POLG) que atua especificamente na replicação do DNA de mitocôndria, foi identificada na rede de ATP13A1.

6 CONCLUSÕES

- A curcumina possui efeito inibitório no cultivo de células de *Schizosaccharomyces pombe*;
- A curcumina promove mudanças na polaridade celular e citocinese resultando em células com morfologia aberrante e multisseptadas, e com alterações na parede celular;
- Alterações morfológicas causadas pela curcumina se assemelham às características fenotípicas de células mutantes *cta4Δ* deficientes para P5A ATPase Cta4;
- A cepa *cta4Δ* é mais sensível aos efeitos causados pela curcumina, quando comparada à cepa *wt*;
- O efeito da curcumina é revertido pela suplementação com FeSO₄ indicando que a curcumina interfere com os níveis intracelulares de ferro;
- A curcumina causa intensa fragmentação vacuolar indicando alterações no processo de fusão/fissão vacuolar;
- O gene ATP13A1 que codifica para P5A-ATPase de humanos apresenta níveis de expressão elevados em diversas células tumorais relacionando a ATPase com ativação contínua da via de sobrevivência UPR e adaptação ao estresse de RE.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Curcumin induces apoptosis and cell cycle arrest via the activation of reactive oxygen species-independent mitochondrial apoptotic pathway in Smad4 and p53 mutated colon adenocarcinoma HT29 cells. **Nutrition Research**, v. 51, p. 67-81, 2018.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 6ª Ed., 1464p, 2010.
- AKHMANOVA, A.; STEINMETZ, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 4, p. 309-322, 2008.
- ANNESLEY, S. J., FISHER, P. R. Mitochondria in Health and Disease. **Cells**. v. 8, p. 680, 2019.
- ARMSTRONG, J. Yeast vacuoles: more than a model lysosome. **Trends in Cell Biology**, v. 20, n. 10, p. 580-585, 2010.
- AZAD, G. K. et al. Depletion of cellular iron by curcumin leads to alteration in histone acetylation and degradation of Sml1p in *Saccharomyces cerevisiae*. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e59003, 2013.
- BADKE, M. R. et al. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais e o cuidado de enfermagem. 96f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2008.
- BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina-I. Avaliação in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 301-314, 2006.
- BANTA, L. M. et al. Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. **Journal of Cell Biology**, v. 107, n. 4, p. 1369-1383, 1988.
- BARANKEVICZ, G. B. **Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão**. 2015. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2015.
- BARBOSA, S. O. S. et al. Mecanismos moleculares de ação de compostos bioativos na prevenção de câncer. 2018. 36f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, 2018.
- BASSETT, D. E.; BOGUSKI, M. S.; HIETER, P. Yeast genes and human disease. **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 589-590, 1996.
- BERNABÉ-PINEDA, M. et al. Spectrophotometric and electrochemical determination of the formation constants of the complexes Curcumin-Fe (III)-water and Curcumin-Fe (II)-water. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 60, n. 5, p. 1105-1113, 2004.

- BODE, H. P. et al. Iron sequestration by the yeast vacuole: a study with vacuolar mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 228, n. 2, p. 337-342, 1995.
- BONE, N. et al. Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. **Current Biology**, v. 8, n. 3, p. 135-144, 1998.
- BORGES, G. A. et al. Curcumin downregulates the PI3K–AKT–mTOR pathway and inhibits growth and progression in head and neck cancer cells. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 12, p. 3311-3324, 2020.
- BOTSTEIN, D.; FINK, G. R. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. **Genetics**, v. 189, n. 3, p. 695-704, 2011.
- BOWNE-ANDERSON, H.; HIBBEL, A.; HOWARD, J. Regulation of microtubule growth and catastrophe: unifying theory and experiment. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 12, p. 769-779, 2015.
- BRAVO-SAGUA, R. et al. Calcium transport and signaling in mitochondria. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 2, p. 623-634, 2011.
- BRAVO-SAGUA, R. et al. Organelle communication: signaling crossroads between homeostasis and disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 50, p. 55-59, 2014.
- CALFON, M. et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 92-96, 2002.
- CAMATARI, F. O. S. et al. Determinação de curcuminoides e avaliação da capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de extratos de *Curcuma longa* e constituintes isolados. 2017. 149f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2017.
- CASEY, J. R.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. Sensors and regulators of intracellular pH. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 50-61, 2010.
- CECILIO FILHO, A. B. et al. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, p. 171-177, 2000.
- CHADWICK, W. L. et al. Non-random distribution of vacuoles in *Schizosaccharomyces pombe*. **Physical Biology**, v. 17, n. 6, p. 065004, 2020.
- CHAN, Y. H. M. et al. Organelle size scaling of the budding yeast vacuole by relative growth and inheritance. **Current Biology**, v. 26, n. 9, p. 1221-1228, 2016.
- CHANDRASHEKAR D. S., et al. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. **Neoplasia**, 19(8):649-658, 2017.
- CHEN, Y. et al. Iron metabolism and its contribution to cancer. **International journal of oncology**, v. 54, n. 4, p. 1143-1154, 2019.

- COGO, A. J. D. et al. Plasma membrane H⁺ pump at a crossroads of acidic and iron stresses in yeast-to-hypha transition. **Metallomics**, v. 12, n. 12, p. 2174-2185, 2020.
- COHEN, S.; VALM, A. M.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Interacting organelles. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 53, p. 84-91, 2018.
- COHEN, Y. et al. The yeast P5 type ATPase, Spf1, regulates manganese transport into the endoplasmic reticulum. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e85519, 2013.
- COLLINO, L. Curcumina: de especiaria à nutracêutico. 2014. 88f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2014.
- COONROD, E. M. et al. Homotypic vacuole fusion in yeast requires organelle acidification and not the V-ATPase membrane domain. **Developmental Cell**, v. 27, n. 4, pág. 462-468, 2013.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **A Célula-: Uma Abordagem Molecular**. Artmed Editora, 2016.
- COUGHLAN, C. M.; BRODSKY, J. L. Use of yeast as a model system to investigate protein conformational diseases. **Molecular Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 171-180, 2005.
- DE COS, P. S.; PÉREZ-URRIA, E. Cúrcuma I (*Cúrcuma Longa* L.). **Reduca (Biología)**, v. 7, n. 2, 2014.
- DESAI, A.; MITCHISON, T. J. Microtubule polymerization dynamics. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, n. 1, p. 83-117, 1997.
- DESFOUGÈRES, Y. et al. Organelle acidification negatively regulates vacuole membrane fusion in vivo. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2016.
- DUNN, T.; GABLE, K.; BEELER, T. Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7273-7278, 1994.
- DURCAN, T. M.; FON, E. A. The three ‘P’s of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. **Genes & development**, v. 29, n. 10, p. 989-999, 2015.
- FERREIRA, L. C. Efeito da curcumina na angiogênese em modelo experimental de câncer de mama. 2014. 56 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2014.
- FLORES-RODRIGUEZ, N. et al. Roles of dynein and dynactin in early endosome dynamics revealed using automated tracking and global analysis. **PloS One**, v. 6, n. 9, p. e24479, 2011.
- FOURY, F. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. **Gene**, v. 195, n. 1, p. 1-10, 1997.
- FOURY, F.; ROGANTI, T. Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24475-24483, 2002.

FREITAS, V. A. Q. et al. Ação da curcumina e morina em leveduras do Complexo *Cryptococcus neoformans*. 2017. 116f. Dissertação (Mestrado em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2017.

FRIEDMAN, J. R. et al. Endoplasmic reticulum–endosome contact increases as endosomes traffic and mature. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 7, p. 1030-1040, 2013.

GADILA, S. K. G.; KIM, K. Cargo trafficking from the *trans*-Golgi network towards the endosome. **Biology of the Cell**, v. 108, n. 8, p. 205-218, 2016.

GARCEA, G. et al. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by câncer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 14, n. 1, p. 120-125, 2005.

GENECARDS®. The Human Gene DataBase 2021. Disponível em: <<https://www.genecards.org/>>. Acesso em: 19 Jan. 2021.

GHASEMI, F. et al. Curcumin inhibits NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways in cervical cancer cells. **Pathology-Research and Practice**, v. 215, n. 10, p. 152556, 2019.

GOLLHOFER, J. et al. Vacuolar-iron-transporter1-like proteins mediate iron homeostasis in *Arabidopsis*. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110468, 2014.

GONÇALVES, B. L. Cancro colorretal e inflamação-vias celulares e alvos farmacológicos. 2015. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Algarve. 2015.

GOTTSCHLING, D. E.; NYSTRÖM, T. The upsides and downsides of organelle interconnectivity. **Cell**, v. 169, n. 1, p. 24-34, 2017.

GTEX PORTAL. Gene expressiona for ATP13A1. 2021 Disponível em: <www.gtexportal.org/home/gene/ATP13A1>. Acesso em: 19 Jan. 2021.

GUO, Y.; SIRKIS, D. W.; SCHEKMAN, R. Protein sorting at the *trans*-Golgi network. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, p. 169-206, 2014.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, F. et al. Curcumin alters the cytoskeleton and microtubule organization on trophozoites of *Giardia lamblia*. **Acta Tropica**, v. 172, p. 113-121, 2017.

HAGAN, I. M.; GRALLERT, A.; SIMANIS, V. Analysis of the *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 9, p. pdb. top082800, 2016.

HAMASAKI, M. et al. Autophagosomes form at ER–mitochondria contact sites. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 389-393, 2013.

HAMDI, A. et al. Erythroid cell mitochondria receive endosomal iron by a “kiss-and-run” mechanism. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2859-2867, 2016.

HARIRI, H. et al. Lipid droplet biogenesis is spatially coordinated at ER–vacuole contacts under nutritional stress. **EMBO Reports**, v. 19, n. 1, p. 57-72, 2018.

HARTWELL, L. H. Nobel lecture: Yeast and cancer. **Bioscience Reports**, v. 22, n. 3-4, p. 373-394, 2002.

HAYASHI, T.; SU, T. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca^{2+} signaling and cell survival. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 596-610, 2007.

HERRERA-CRUZ, M. S.; SIMMEN, T. Of yeast, mice and men: MAMs come in two flavors. **Biology Direct**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 2017.

HETZ, C.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 8, p. 421-438, 2020.

HOFFMAN, C. S.; WOOD, V.; FANTES, P. A. An ancient yeast for young geneticists: a primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system. **Genetics**, v. 201, n. 2, p. 403-423, 2015.

HU, Y. et al. Endoplasmic reticulum stress and pulmonary hypertension. **Pulmonary Circulation**, v. 10, n. 1, p. 2045894019900121, 2020.

HUANG, Y. et al. Biological and pharmacological effects of hexahydrocurcumin, a metabolite of curcumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 646, p. 31-37, 2018.

HUGHES, A. L.; GOTTSCHLING, D. E. An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. **Nature**, v. 492, n. 7428, p. 261-265, 2012.

JAHANSHIRI, Z. et al. Effect of curcumin on *Aspergillus parasiticus* growth and expression of major genes involved in the early and late stages of aflatoxin biosynthesis. **Iranian Journal of Public Health**, v. 41, n. 6, p. 72, 2012.

JI, G. et al. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release through localized Ca^{2+} uncaging in smooth muscle. **The Journal of General Physiology**, v. 127, n. 3, p. 225-235, 2006.

JIAO, Y. et al. Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 113, n. 2, p. 462-469, 2009.

JORGENSEN, P. L.; HÅKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. D. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annual Review of Physiology**, v. 65, n. 1, p. 817-849, 2003.

KARATHIA, H. et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. **PLoS One**, v. 6, n. 2, 2011.

KAUFMAN, R. J.; MALHOTRA, J. D. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 10, p. 2233-2239, 2014.

KAUSAR, S.; WANG, F.; CUI, H. The role of mitochondria in reactive oxygen species generation and its implications for neurodegenerative diseases. **Cells**, v. 7, n. 12, p. 274, 2018.

KELLERMAYER, R. et al. Extracellular Ca^{2+} sensing contributes to excess Ca^{2+} accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1 Δ* mutant of *S. cerevisiae*. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 8, p. 1637-1646, 2003.

KIM, S. W. et al. Curcumin treatment in combination with glucose restriction inhibits intracellular alkalization and tumor growth in hepatoma cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2375, 2019.

KLIONSKY, D. J.; HERMAN, PI K.; EMR, S. D. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 54, n. 3, p. 266-292, 1990.

KORNMANN, B. et al. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. **Science**, v. 325, n. 5939, p. 477-481, 2009.

KUMAR, A. et al. Curcumin targets cell wall integrity via calcineurin-mediated signaling in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 167-175, 2014.

KUNCHANDY, E.; RAO, M. N. A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **International journal of pharmaceutics**, v. 58, n. 3, p. 237-240, 1990.

KUNDU, D.; PASRIJA, R. The ERMES (Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Encounter Structures) mediated functions in fungi. **Mitochondrion**, v. 52, p. 89-99, 2020.

LABBÉ, K.; MURLEY, A.; NUNNARI, J. Determinants and functions of mitochondrial behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, p. 357-391, 2014.

LEE, S. S. et al. Whole lifespan microscopic observation of budding yeast aging through a microfluidic dissection platform. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 109, n. 13, p. 4916-4920, 2012.

LELLI, D.; PEDONE, C.; SAHEBKAR, A. Curcumin and treatment of melanoma: The potential role of microRNAs. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 832-834, 2017.

LEVINE, T. P.; PATEL, S. Signalling at membrane contact sites: two membranes come together to handle second messengers. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 39, p. 77-83, 2016.

LEWIS, S. C.; UCHIYAMA, L. F.; NUNNARI, J. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. **Science**, v. 353, n. 6296, 2016.

LI, L. et al. CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 29515-29519, 2001.

LIU, Y. et al. Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 24, n. 11, p. 4635-4651, 2012.

- LOGAN-SMITH, M. J. et al. Curcumin, a molecule that inhibits the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum but increases the rate of accumulation of Ca²⁺. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 46905-46911, 2001.
- LUSTOZA, A. C. D. M et al. P5A-type ATPase Cta4p is essential for Ca²⁺ transport in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe*. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27843, 2011.
- MACHIDA, K.; TANAKA, T. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by FOF1-ATPase in yeast. **FEBS Letters**, v. 462, n. 1-2, p. 108-112, 1999.
- MACKENZIE, G. G. et al. Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-κB and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 1, p. 56-65, 2008.
- MALINA, C.; LARSSON, C.; NIELSEN, J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 5, p. foy040, 2018.
- MANZ, D. H. et al. Iron and cancer: recent insights. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1368, n. 1, p. 149, 2016.
- MARCHI, S. et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. **Cell Calcium**, v. 69, p. 62-72, 2018.
- MARQUARDT, J. U. et al. Curcumin effectively inhibits oncogenic NF-κB signaling and restrains stemness features in liver cancer. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 3, p. 661-669, 2015.
- MARTINEZ-MUNOZ, G. A.; KANE, P. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 29, p. 20309-20319, 2008.
- MARTINS, B. X. et al. Myrtenal-induced V-ATPase inhibition-A toxicity mechanism behind tumor cell death and suppressed migration and invasion in melanoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1863, n. 1, p. 1-12, 2019.
- Martins, T.S., Costa, V., Pereira, C. Signaling pathways governing iron homeostasis in budding yeast. **Molecular Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 422-432, 2018
- MASUELLI, L. et al. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cell lines and delays the growth of mammary tumors in neu transgenic mice. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 27, n. 1, p. 105-119, 2013.
- MAXFIELD, F. R.; MCGRAW, T. E. Endocytic recycling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 2, p. 121-132, 2004.

- MICHAELI, S.; AVIN-WITTENBERG, T.; GALILI, G. Involvement of autophagy in the direct ER to vacuole protein trafficking route in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 134, 2014.
- MINEAR, S. et al. Curcumin inhibits growth of *Saccharomyces cerevisiae* through iron chelation. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1574-1581, 2011.
- MHILLAJ, E. et al. Curcumin and heme oxygenase: neuroprotection and beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2419, 2019.
- MORENO S.; KLAR A.; NURSE P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Methods Enzymol.** 194:795-823, 1991.
- MULVIHILL, D. P. et al. Myosin V-mediated vacuole distribution and fusion in fission yeast. **Current Biology**, v. 11, n. 14, p. 1124-1127, 2001.
- NAPIER, I.; PONKA, P.; RICHARDSON, D. R. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 1867-1874, 2005.
- NEELOFAR, K. et al. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 204-210, 2011.
- NELSON, N. The vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase--one of the most fundamental ion pumps in nature. **Journal of Experimental Biology**, v. 172, n. 1, p. 19-27, 1992.
- NIE, G. et al. Overexpression of mitochondrial ferritin causes cytosolic iron depletion and changes cellular iron homeostasis. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 2161-2167, 2005.
- NIELSEN, E. et al. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. **Nature Cell Biology**, v. 1, n. 6, p. 376-382, 1999.
- OAKES, S. A.; PAPA, F. R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, p. 173-194, 2015.
- OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L., APPELGREN, H., TABISH, M., OKOROKOV, L. A., EKWALL, K. (2002) The endoplasmic reticulum cation P-type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamic. **Journal of Cell Biology** 157: 1029-1040.
- OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; COGO, A. J. D.; PALMA, L. M. Role of P 5A-Type ATPase in Ion Homeostasis and Signaling: Shedding Light on Obscure Pump. In: **Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPases**. Springer, Cham, 2016. p. 551-565.
- OTONI, E. S. B.; NARDIN, J. M. Avaliação da citotoxicidade de curcuminóides em células linfocitárias normais. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 11, 2017.
- PALMA, H. E. et al. Parâmetros de estresse oxidativo no sangue, fígado e rins de ratos diabéticos tratados com curcumina e/ou insulina. 2013. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

- PARRALES, A.; IWAKUMA, T. Targeting oncogenic mutant p53 for cancer therapy. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 288, 2015.
- PAUL, B. T. et al. Mitochondria and Iron: current questions. **Expert Review of Hematology**, v. 10, n. 1, p. 65-79, 2017.
- PETERS, C. et al. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. **Nature**, v. 409, n. 6820, p. 581-588, 2001.
- PETERSEN, J.; RUSSELL, P. Growth and the environment of *Schizosaccharomyces pombe*. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 3, p. pdb. top079764, 2016.
- POMBASE, The scientific resource for fission yeast. **Orthologs**. Disponível em: <pombase.org>. Acesso em: 6 de jan. de 2021.
- POZNIAKOVSKY, A. I. et al. Role of mitochondria in the pheromone-and amiodarone-induced programmed death of yeast. **The Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 2, p. 257-269, 2005.
- PRADO-AUDELO, D. et al. Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, p. 56, 2019.
- PRESTON, R. A.; MURPHY, R. F.; JONES, E. W. Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 18, p. 7027-7031, 1989.
- PUIG, S. et al. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. **Metallomics**, v. 9, n. 11, p. 1483-1500, 2017.
- RABELO, A. S.; BRETAS, M. L.; GUILLO, L. A. Ensaio da citotoxicidade da curcumina. VI Reunião Regional da SBBq. Anais eletrônicos da VI Reunião Regional da SBBq (CDROM), Fortaleza, Brazil. Shankar, S., Srivastava, RK (2007), Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol, v. 3, p. 905-918, 2002.
- RANGEL-CASTAÑEDA, I. A. et al. Amoebicidal activity of curcumin on *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 426-433, 2018.
- REID, D. W.; NICCHITTA, C. V. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 221-231, 2015.
- RICHARDSON, D. R. et al. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 24, p. 10775-10782, 2010.
- RÖTHLISBERGER, S. et al. The dynamin-related protein Vps1 regulates vacuole fission, fusion and tubulation in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 12, p. 927-935, 2009.

ROUAULT, T. A. Mitochondrial iron overload: causes and consequences. **Current opinion in genetics & development**, v. 38, p. 31-37, 2016.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 10, p. 469-476, 2007.

DOS SANTOS, S.C., SÁ-CORREIA, I. Genome-wide identification of genes required for yeast growth under imatinib stress: vacuolar H⁺-ATPase function is an important target of this anticancer drug. **OMICS**. 13(3):185-98, 2009.

SAMARÃO, S. S. et al. V H⁺-ATPase along the yeast secretory pathway: energization of the ER and Golgi membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1788, n. 2, p. 303-313, 2009.

SCHÖNTHAL, A. H. Endoplasmic reticulum stress and autophagy as targets for cancer therapy. **Cancer letters**, v. 275, n. 2, p. 163-169, 2009.

SCOTT, C. C.; VACCA, F.; GRUENBERG, J. Endosome maturation, transport and functions. In: **Seminars in Cell and Developmental Biology**. Academic Press, p. 2-10, 2014.

SEO, J. et al. Curcumin induces apoptosis by inhibiting sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase activity in ovarian cancer cells. **Cancer Letters**, v. 371, n. 1, p. 30-37, 2016.

SHEFTEL, A. D. et al. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 125-132, 2007.

SHEN, Y. et al. Curcumin inhibits the tumorigenesis of breast cancer by blocking tafazzin/yes-associated protein axis [Retraction]. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 5739-5740, 2020.

SHI, J. et al. Antitumor effects of curcumin in human bladder cancer in vitro. **Oncology Letters**, v. 14, n. 1, p. 1157-1161, 2017.

SHIN J. J. et al. Systematic identification of genes involved in metabolic acid stress resistance in yeast and their potential as cancer targets. **Disease Models and Mechanisms**. 2016 9(9):1039-49.

SICARI, D. et al. A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems. **The FEBS Journal**, v. 287, n. 1, p. 27-42, 2020.

SØRENSEN, D. M. et al. Parkinson disease related ATP13A2 evolved early in animal evolution. **PloS One**, v. 13, n. 3, p. e0193228, 2018.

STEPIEN K. et al. Impact of curcumin on replicative and chronological aging in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. **Biogerontology** 21:109-123, 2020.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumina, o pó dourado do açafão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

TABAS, I.; RON, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 184-190, 2011.

TAKEGAWA, K. et al. Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*. **Cell Structure and Function**, v. 28, n. 5, p. 399-417, 2003.

TOMEH, M. A.; HADIANAMREI, R.; ZHAO, X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1033, 2019.

TORTI, S. V.; TORTI, F. M. Iron and cancer: more ore to be mined. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 5, p. 342-355, 2013.

VESES, V.; RICHARDS, A.; GOW, N. A. R. Vacuoles and fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 503-510, 2008.

VIOTTI, C. et al. The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3434-3449, 2013.

WANG, B. et al. Improving anti-melanoma effect of curcumin by biodegradable nanoparticles. **Oncotarget**, v. 8, n. 65, p. 108624, 2017.

WANG, M.; KAUFMAN, R. J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 326-335, 2016.

WARDE-FARLEY D, DONALDSON SL, COMES O, ZUBERI K, BADRAWI R, CHAO P, FRANZ M, GROUIOS C, KAZI F, LOPES CT, MAITLAND A, MOSTAFAVIS, MONTOJO J, SHAO Q, WRIGHT G, BADER GD, MORRIS Q. **Nucleic Acids Research**, 38 Suppl: W214-20, 2010.

WATSON, J. L. et al. Curcumin causes superoxide anion production and p53-independent apoptosis in human colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 297, n. 1, p. 1-8, 2010.

WEISMAN, L. S.; BACALLAO, R.; WICKNER, W. Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle. **Journal of Cell Biology**, v. 105, n. 4, p. 1539-1547, 1987.

WESTRATE, L. M. et al. Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 791-811, 2015.

WILKEN, R. et al. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 12, 2011.

WOO, J. H. et al. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-X L and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 7, p. 1199-1208, 2003.

WOOD, V. et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nature**, v. 415, n. 6874, p. 871, 2002.

- XIANG, L.; ETXEBERRIA, E.; VAN DEN ENDE, W. Vacuolar protein sorting mechanisms in plants. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 4, p. 979-993, 2013.
- XIE, W.; NG, D. T. W. ERAD substrate recognition in budding yeast. In: **Seminars in Cell and Developmental Biology**. Academic Press, 2010. p. 533-539.
- XU, L.; WANG, X.; TONG, C. Endoplasmic reticulum–mitochondria contact sites and neurodegeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.
- YANG, X. et al. Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress. **The Plant Journal**, v. 85, n. 1, p. 83-95, 2016.
- YOSHIDA, H. et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 881-891, 2001.
- ZAJAC, A. L. et al. Local cytoskeletal and organelle interactions impact molecular-motor-driven early endosomal trafficking. **Current Biology**, v. 23, n. 13, p. 1173-1180, 2013.
- ZERIAL, M.; MCBRIDE, H. Rab proteins as membrane organizers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 107-117, 2001.
- ZHAO, Z. et al. Curcumin induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the induction of forkhead box O1 and inhibition of the PI3K/Akt pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 4, p. 5415-5422, 2015.
- ZHANG, C. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. **Protein and Cell**, v. 5, n. 10, p. 750-760, 2014.
- ZHANG, J. et al. Curcumin targets the TFEB-lysosome pathway for induction of autophagy. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, p. 75659, 2016.
- ZHANG, L. et al. Curcumin induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells via disruption of intracellular calcium homeostasis. **Medicine**, v. 97, n. 24, 2018.
- ZHANG, X. et al. Curcumin affects gastric cancer cell migration, invasion and cytoskeletal remodeling through Gli1- β -catenin. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 3795, 2020.
- ZHOU, H.; S BEEVERS, C.; HUANG, S. The targets of curcumin. **Current drug targets**, v. 12, n. 3, p. 332-347, 2011.
- ZHOU, X. et al. Curcumin inhibits the growth of triple-negative breast cancer cells by silencing EZH2 and restoring DLC1 expression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 18, p. 10648-10662, 2020.
- ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.